



Soraya Queiroz Rodrigues Imperial

Caracterização de biomarcadores geoquímicos orgânicos em solos e águas subterrâneas

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Química Bioorgânica

Orientador: Professora Doutora Elvira Maria M. Gaspar



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Novembro 2016



Soraya Queiroz Rodrigues Imperial

Caracterização de biomarcadores geoquímicos orgânicos em solos e águas subterrâneas

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Química Bioorgânica

Orientador: Professora Doutora Elvira Maria M. Gaspar

Júri:

Presidente: Professora Doutora Paula Cristina de Sérgio Branco

Arguente: Professor Doutor Abel José de Sousa Costa Vieira

Vogal: Professora Doutora Elvira Maria M. Gaspar



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Novembro 2016

Caracterização de biomarcadores geoquímicos orgânicos em solos e águas subterrâneas

Copyright © Soraya Queiroz Rodrigues Imperial, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Esta dissertação foi escrita ao abrigo do antigo Acordo Ortográfico.

Agradecimentos

À Professora Elvira Gaspar; no fundo, por tudo. Pela oportunidade de trabalhar consigo e por ter acreditado em mim, pela orientação e conhecimentos transmitidos, pela personalidade marcante que tem o dom de virar do avesso as dificuldades e encontrar rumos quando eu já não sabia por onde me orientar, por me ajudar a tornar-me qualquer coisa mais parecida com uma “química”. Em suma, por tudo que por mim fez nos últimos dois difíceis anos.

A José Santana, incansável colega de laboratório que orientou (e aturou) todos os meus esforços, angústias e dificuldades; que não se aborreceu por eu avariar (com uma aura mística) todos os equipamentos e objectos num raio de dez metros sem sequer lhes tocar, que partilhou histórias e conhecimentos e que foi uma peça fundamental do meu sucesso.

Aos meus pais, por terem aceite passivamente a minha decisão descabida de ingressar num mestrado para o qual não tinha qualquer base académica e ficarem a ver esta crónica de fracasso anunciado a desenrolar-se lentamente (e com muita dificuldade). Após já ter tido anunciado várias vezes que odiava Química Orgânica e ter passado a essa disciplina da licenciatura com imensa dificuldade, fico agradecida por não terem a impulsividade de me internarem numa instituição psiquiátrica quando eu enviei a candidatura.

A Alexandra Fernandes, pelo apoio incondicional, amor e amizade, as críticas pertinentes, os conhecimentos de Química Analítica, a paciência mais que infinita para as minhas frustrações técnicas e o dom de saber dizer as palavras certas no momento certo.

À minha avó Maria Adelaide. Uma vez mais, por “apostares forte em mim”. Pelo apoio durante a difícil etapa curricular do mestrado e pela cómica comparação que durou dois anos, entre o teu mestrado em Literatura (que me deixaste redigir e corrigir) e o meu, por não compreenderes porque é que eu não podia somente sentar-me e escrever a dissertação.

À minha família de farda dos Bombeiros Voluntários de Barcarena: àqueles que sempre me apoiaram e procuraram ajudar-me a escrever, aos que me distraíram em todas as oportunidades possíveis com brincadeiras, e à grande maioria que manifestou profunda incompreensão e preocupação por eu passar infindas madrugadas de serviço acordada e agarrada ao computador. Sem vocês, eu teria acabado a dissertação muito mais cedo, mas teria os dias mais vazios também.

E a todos aqueles que, directa e indirectamente, contribuíram para que eu não desistisse perante a dificuldade de fazer um mestrado sem ter uma licenciatura na área, que tentaram que eu acreditasse em mim mesma e que me alegraram os momentos mais baixos deste percurso.

Resumo

O objectivo inicial desta dissertação de estrado foi a caracterização de biomarcadores geoquímicos orgânicos em solos e águas subterrâneas. Para tal, foi efectuado o desenvolvimento e validação de alguns parâmetros de um método analítico para caracterização de hidrocarbonetos em amostras de solos e águas. O estudo envolveu a aplicação da micro-extracção em fase sólida (SPME) como método de preparação de amostra e a avaliação de diferentes fases estacionárias de líquidos iónicos estáveis à temperatura ambiente (RTIL) e de uma fase estacionária quiral (ciclodextrina) para uso em cromatografia gasosa (GC-FID), tendo como objectivo a identificação e a quantificação de biomarcadores geoquímicos orgânicos adequados à datação de derrames ambientais. Foram determinados os parâmetros experimentais mais adequados à metodologia micro-extracção em fase sólida em *headspace* associado à cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (HS-SPME-GC-FID): tipo de fibra SPME, tempo de exposição, temperatura de exposição e a melhor fase estacionária de líquidos iónicos (RTIL). Utilizando a coluna de ciclodextrina, foi efectuada a separação de isómeros dos biomarcadores pristano e fitano, a qual foi aplicada a amostras reais.

A utilização da microextracção em fase sólida como método de preparação de amostra quando associada à cromatografia gasosa (HS-SPME-GC) mostrou-se uma metodologia analítica que possui vantagens ao nível de implementação por equipas técnicas que lidam com grandes números de amostras de origem forense, motivo que sustentou o trabalho de desenvolvimento da presente dissertação de Mestrado com enfoque no contexto de crimes ambientais.

Palavras-Chave: química bioorgânica analítica; hidrocarbonetos; biomarcadores geoquímicos; *headspace*; HS-SPME; GC-FID

Abstract

The initial aim of this Master thesis was the characterisation of organic geochemistry biomarkers in soil and groundwater. For this purpose, the development and validation of some parameters of an analytical method were performed for characterisation of hydrocarbons in samples of soil and water. The study involved the use of solid phase microextraction (SPME) as a sample preparation method and the evaluation of different ionic liquids stable at room temperature (RTIL) as stationary phases as well as a chiral stationary phase (cyclodextrin) to be used in gas chromatography with flame ionization detection (GC-FID) for identification and quantification of organic geochemistry biomarkers appropriate for dating environmental spills. The most suitable experimental parameters of headspace solid phase microextraction associated to gas chromatography with flame ionization detection (HS-SPME-GC-FID) method were determined: SPME fiber type, exposure time, exposure temperature and the best ionic liquid stationary phase. The stereoisomeric separation of pristane and fitane biomarkers using the cyclodextrin column was accomplished and it was applied to real samples.

The use of solid phase microextraction as a sample preparation method when combined with gas chromatography (HS-SPME-GC) showed to be an adequate analytical method having advantages in terms of implementation by technical staff who deal with large numbers of samples of forensic origin, reason that supported the work developed in this Master's thesis with interest for the context of environmental crimes.

Keywords: Bioorganic analytical chemistry; hydrocarbons; geochemistry biomarkers; headspace; HS-SPME; GC-FID

Índice de Conteúdos

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vii
Índice de Conteúdos	ix
Índice de Figuras	xi
Índice de Tabelas	xv
Lista de Abreviaturas, Símbolos e Designações Anglo-Saxónicas.....	xvii
Capítulo 1 – Introdução Teórica	1
1.1 Enquadramento.....	1
1.2 Petróleo: Derrames e escorrências de combustíveis.....	2
1.3 Biomarcadores geoquímicos e sua relevância	4
1.4 Determinação analítica de biomarcadores geoquímicos	8
1.4.1 Preparação de Amostra.....	8
1.4.2 Métodos Cromatográficos	10
1.4.2.1 Líquidos Iónicos como fase estacionária em Cromatografia Gasosa.....	16
1.4.2.2 Compostos quirais como fase estacionária em Cromatografia Gasosa.....	21
Capítulo 2 – Procedimento Experimental	26
2.1 Amostras.....	26
2.2 Preparação de Amostra (SPME).....	26
2.3 Análise Cromatográfica.....	27
2.4 Validação do Método Analítico	28
Capítulo 3 – Resultados e Discussão	30
3.1 Método de Preparação de Amostra (SPME)	30
3.1.1 Fibra.....	30
3.1.2 Tempo de Exposição.....	31
3.1.3 Temperatura de Exposição	33
3.2 Análise Cromatográfica.....	34
3.2.1 Colunas HP-5ms e SLB-5ms	34
3.2.2 Coluna SLB-IL60	35
3.2.3 Coluna SLB-IL82	36
3.2.4 Coluna SLB-IL100	37

3.3 Identificação de Biomarcadores	39
3.3.1 Determinação aquiral	39
3.3.2 Análise com coluna cromatográfica quiral	42
3.4 Validação do Método Analítico	45
3.4.1 Biomarcadores em Hexano	45
3.4.2 Biomarcadores em Água	45
3.4.3 Biomarcadores em Mistura Padronizada	47
Capítulo 4 – Conclusões e Perspectivas	51
Capítulo 5 - Bibliografia	53

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Petróleo não refinado (crude) ¹⁰	2
Figura 1.2 - Cromatograma, obtido por Cromatografia Gasosa com Detecção por Ionização de Chama (GC-FID), de hidrocarbonetos e biomarcadores mais usuais (Adaptado de Wang et al ²⁷)	5
Figura 1.3 - Estrutura geral dos A) Esteranos, B) Esteranos Monoaromáticos (de anel C) e C) Esteranos Triaromáticos	5
Figura 1.4 - Botriococano produzido pela alga <i>Botryococcus braunii</i> (Adaptado de Moldowan et al ³⁰)	6
Figura 1.5 - Alteração do perfil cromatográfico de massa (m/z 83) de gasolina não degradada (A) para gasolina moderadamente degradada (B) (Adaptado de Kaplan et al ²⁹)	6
Figura 1.6 - Traçados analíticos GC-FID da zona geográfica de Alberta, Canadá: A) Areia betuminosa e B) Mistura de hidrocarbonetos (tradicional) extraída por métodos convencionais (<i>Alberta Sweet Mixed Blend</i>) (Adaptado de Yang et al ²²) Sub: Padrão Substituto (<i>Surrogate Standards</i> : o-terfenil, naftaleno, acenaftaleno, fenantreno, benz[a]antraceno e perileno deuterados), PI: Padrão Interno (Mistura para quantificação de hidrocarbonetos saturados, aromáticos e PAHs)	7
Figura 1.7 - Utilização analítica da presença de UCM em extractos de solo como biomarcadores de zona geográfica: a) Wild Harbor River e b) Narragansett Bay (Adaptado de Frysinger et al ³⁴)	8
Figura 1.8 - Ilustração da utilização de SPME como método de preparação de amostra	9
Figura 1.9 - Polidimetilsiloxano (PDMS)	10
Figura 1.10 - Divinilbenzeno (DVB; a denominação comercial DVB inclui ambos os isómeros <i>meta</i> e <i>para</i> em proporções variáveis dependendo do fabricante)	10
Figura 1.11 - Esquema Geral de um Cromatógrafo Gasoso ⁴⁹	11
Figura 1.12 - Representação da equação de Van Deemter - $HETP = A + (B/u) + Cu$. Os tracejados representam as diferentes variáveis da equação, a hipérbole representa a equação. H=HTEP. (Adaptado de Grob et al ⁴⁸)	12
Figura 1.13 - Esquema de um FID (Adaptado de Grob et al ⁴⁸)	13
Figura 1.14 - Fundamentos da análise por Espectrometria de Massa (Adaptado de Dass ⁵³)	13
Figura 1.15 - Fragmentações possíveis de uma espécie hipotética ABYZ sob ionização forte (EI) (Adaptado de Gross ⁵⁴)	14
Figura 1.16 - A) GC-MS (SIM: m/z 85.00) de crude do petroleiro Arrow armazenado e B) GC-FID de crude recolhido em 1992 do derrame na Baía Chedabucto (Canadá) pelo petroleiro Arrow em 1970 (Adaptado de Wang et al ⁶²)	15
Figura 1.17 - Polissiloxano	17
Figura 1.18 - Polietilenoglicol (PEG)	17
Figura 1.19 - Escala comparativa de fases estacionárias de GC indicando as constantes de Reynolds e temperaturas máximas de cada coluna. Do lado esquerdo, as colunas tradicionais e do lado direito, as colunas IL da Supelco ⁷³	19
Figura 1.20 - Comparação do <i>bleeding</i> de cinco colunas: DB-Wax, HP-88 e HP-5ms (colunas tradicionais) e SLB-IL100 e SLB-IL82 (colunas de líquidos iónicos) (Adaptado de Gu et al ⁷⁶)	20
Figura 1.21 - Comparação de tempos de retenção e ordem de eluição em colunas de líquidos iónicos e coluna TCEP, num programa isotérmico a 110°C. Compostos - 1: n-tridecano, 2: tolueno, 3: etilbenzeno, 4: p-xileno, 5: isopropilbenzeno (cumeno), 6: 1,2,4-trimetilbenzeno, 7: 1,2,4,5-tetrametilbenzeno (dureno), 8: ciclohexanona (Adaptado de Sigma Aldrich ⁷⁸)	19
Figura 1.22 - a) Estrutura geral das Ciclodextrinas b) Representação esquemática da estrutura tridimensional geral como toróide (Adaptado de Britto et al ⁸⁵)	22
Figura 1.23 - Separação de compostos BTEX e isómeros do xileno por GC-FID utilizando uma coluna quiral (CP-Chirasil-Dex): 1: benzeno, 2: tolueno, 3: p-xileno, 4: m-xileno, 5: etilbenzeno, 6: o-xileno,	

7: estireno, 8: cumeno. Condições: 80°C (6min) -> 130°C, 25°C/min, Split, Temp. Injector=210°C, Temp. Detector=230°C (Adaptado de Agilent Technologies, Inc ⁹⁰)	22
Figura 1.24 - Estruturas dos principais isoprenóides e identificação dos seus centros estereogênicos.	23
Figura 1.25 - A) Separação de epímeros (<i>R</i> -C ₁₄ e <i>S</i> -C ₁₄) de fitano (2,6,10,14-tetrametilhexadecano) e de crocetano (2,6,11,15-tetrametilhexadecano), isotérmica de 140°C, da fracção ramificada de crude de Blina-2 Canning Basin, B) Separação dos epímeros do fitano, isotérmica de 100°C C) Separação dos estereoisômeros do crocetano, isotérmica de 90°C. Análise por GC-MS com a coluna ChiralDEX B-PH, fase estacionária composta por permetil-(<i>S</i>)-2-hidroxiopropil-β-ciclodextrina (Adaptado de Huang et al ⁹¹)	23
Figura 1.26 - GC-FID de misturas racêmicas de 3-metilhexano, 2,3-dimetilpentano, 2,4-dimetilhexano, 3-metilheptano e 3,4-dimetilhexano com a coluna Chirasil-γ-Dex (esquerda) e Chirasil- β-Dex (direita), em isotérmica a 30°C (Adaptado de Sicoli et al ⁹³).....	24
Figura 1.27 - Estruturas do drimano e 1) 1,2,2,5-Tetrametiltetralina e 2) 1,2,2,5,6-Pentametiltetralina) ...	24
Figura 1.28 - Traçados de monitorização de ião (SIM, m/z 132 e 146) de crude originário de Eromanga Basin, Australia, envolvendo a separação dos enantiômeros das duas tetralinas (a) 1,2,2,5-Tetrametiltetralina e (b) 1,2,2,5,6- Pentametiltetralinautilizando uma fase estacionária quiral (CYDEX-B - (β-ciclodextrina permetilada, similar à ChiralDEX-B)) (Adaptado de Alexander et al ⁹⁶).....	25
Figura 3.1 - GC-MS (XIC, ião m/z 83) de Gasóleo: estudo comparativo de quatro fibras SPME. PDMS (preto), CAR/PDMS (azul), PDMS/DVB (vermelho) e tripla (verde) na coluna SLB-5ms. Condições: 35°C (5min) -> 260°C (10min), 4°C, Split 1/20, Temp. Injector= 270°C, Temp. Ionização= 230°C, Temp. Quadrupolo= 150°C, full scan: 35-550 amu.....	30
Figura 3.2 - GC-MS de Gasolina simples: comparação da extração por SPME, usando quatro fibras: PDMS (preto), CAR/PDMS (azul), PDMS/DVB (vermelho) e tripla (verde) na coluna SLB-5ms. Condições: 35°C (5min) -> 260°C (10min), 4°C, Split 1/20, Temp. Injector= 270°C, Temp. Ionização= 230°C, Temp. Quadrupolo= 150°C, full scan: 35-550 amu.....	31
Figura 3.3 - GC-MS de Gasóleo usando SPME (PDMS); cromatograma parcial envolvendo tempos de exposição: 15 minutos (vermelho), 1 hora (preto) e 2 horas (azul) na coluna SLB-5ms. Condições: 35°C (5min) -> 260°C (10min), 4°C, Split 1/20, Temp. Injector= 270°C, Temp. Ionização= 230°C, Temp. Quadrupolo= 150°C, full scan: 35-550 amu.....	32
Figura 3.4 - GC-MS de Gasolina 95 usando SPME (CAR/PDMS) e 30 minutos de exposição na coluna SLB-5ms. Condições: 35°C (5min) -> 260°C (10min), 4°C, Split 1/20, Temp. Injector= 270°C, Temp. Ionização= 230°C, Temp. Quadrupolo= 150°C, full scan: 35-550 amu.....	32
Figura 3.5 - GC-MS de Gasóleo: 15 minutos de exposição da fibra PDMS com 54°C (preto), 88°C (azul) e temperatura ambiente (vermelho) (cromatograma parcial) na coluna SLB-5ms. Condições: 35°C (5min) -> 260°C (10min), 4°C, Split 1/20, Temp. Injector= 270°C, Temp. Ionização= 230°C, Temp. Quadrupolo= 150°C, full scan: 35-550 amu.....	33
Figura 3.6 - GC-MS de Gasolina 95: SPME (CAR/PDMS) (15 minutos) à temperatura ambiente na coluna SLB-5ms. Condições: 35°C (5min) -> 260°C (10min), 4°C, Split 1/20, Temp. Injector= 270°C, Temp. Ionização= 230°C, Temp. Quadrupolo= 150°C, full scan: 35-550 amu.....	33
Figura 3.7 - GC-FID de Gasolina 95 (cromatograma parcial) na coluna HP-5ms. Condições: 35°C (5min) -> 260°C (10min), 4°C/min, Split 1/20, Temp. Injector= 290°C, Temp. Detector=290°C	34
Figura 3.8 - GC-MS de Gasolina 95 na coluna SLB-5ms. Condições: 35°C (5min) -> 260°C (10min), 4°C, Split 1/20, Temp. Injector= 270°C, Temp. Ionização= 230°C, Temp. Quadrupolo= 150°C, full scan: 35-550 amu.....	35
Figura 3.9 - GC-FID do Pristano na Coluna IL60. Condições: 35°C (5min) -> 260°C (10min), 4°C/min, Split 1/20, Temp. Injector= 290°C, Temp. Detector=290°C	35

Figura 3.10 - GC-FID comparativo de Gasóleo Simples: coluna IL60 (cromatograma superior) e HP-5ms (cromatograma inferior). Condições: 35°C (5min) -> 260°C (10min), 4°C/min, Split 1/20, Temp. Injector= 290°C, Temp. Detector=290°C	36
Figura 3.11 - GC-FID de Gasóleo na Coluna IL82. Condições: 50°C (10min) -> 260°C (10min), 5°C/min, Split 1/20, Temp. Injector= 270°C, Temp. Detector=270°C	37
Figura 3.12 - GC-FID de Gasolina 95 na Coluna IL82. Condições: 50°C (10min) -> 260°C (10min), 5°C/min, Split 1/20, Temp. Injector= 270°C, Temp. Detector=270°C	37
Figura 3.13 - GC-FID do etilbenzeno (vermelho) e 1,2,4,5-tetrametilbenzeno (preto) na coluna IL100. Condições: 35°C (5min) -> 230°C (10min), 4°C/min, Split 1/20, Temp. Injector= 250°C, Temp. Detector=250°C	38
Figura 3.14 - GC-FID de Undecano na coluna IL100. Condições: 35°C (5min) -> 230°C (10min), 4°C/min, Split 1/20, Temp. Injector= 250°C, Temp. Detector=250°C	38
Figura 3.15 - Comparação analítica GC-FID de Gasóleo Simples nas colunas IL100 (cromatograma superior) e HP-5ms (cromatograma inferior). Condições: <u>IL100</u> 35°C (5min) -> 230°C (10min), 4°C/min, Split 1/20, Temp. Injector= 250°C, Temp. Detector=250°C. <u>HP-5ms</u> 35°C (5min) -> 260°C (10min), 4°C/min, Split 1/20, Temp. Injector= 290°C, Temp. Detector=290°C	38
Figura 3.16 - GC-MS de Gasolina 95 (Preto) e comparação/sobreposição aos padrões aromáticos de etilbenzeno (azul), orto-xileno (vermelho) e propilbenzeno (verde) na coluna SLB-5ms. Condições: 35°C (5min) -> 260°C (10min), 4°C, Split 1/20, Temp. Injector= 270°C, Temp. Ionização= 230°C, Temp. Quadrupolo= 150°C, full scan: 35-550 amu.....	39
Figura 3.17 - Sobreposição dos cromatogramas GC-FID de Diluente (Preto), Etilbenzeno (Verde), Undecano (Azul), o-xileno (vermelho) e Propilbenzeno (laranja) na coluna IL60. Condições: 35°C (5min) -> 260°C (10min), 4°C/min, Split 1/20, Temp. Injector= 290°C, Temp. Detector=290°C	40
Figura 3.18 - Sobreposição de Cromatogramas GC-FID o de Combustível de Avião (Preto), Etilbenzeno (Laranja), Propilbenzeno (Vermelho), 1,2,4,5-tetrametilbenzeno (Azul) e Icosano (Verde) na coluna IL100. Condições: 35°C (5min) -> 230°C (10min), 4°C/min, Split 1/20, Temp. Injector= 250°C, Temp. Detector=250°C	40
Figura 3.19 - Análise sobreposta GC-FID de Gasóleo Simples (Preto), Undecano (Vermelho), o-xileno (Azul), 1,2,4,5-tetrametilbenzeno (Laranja) e Pristano (Verde) na coluna IL60. Condições: 35°C (5min) -> 260°C (10min), 4°C/min, Split 1/20, Temp. Injector= 290°C, Temp. Detector=290°C	41
Figura 3.20 - Comparação GC-FID da ordem de eluição do Undecano e Propilbenzeno (Preto e Vermelho) na colunas IL60 e HP-5ms (Azul e Verde). Condições: 35°C (5min) -> 260°C (10min), 4°C/min, Split 1/20, Temp. Injector= 290°C, Temp. Detector=290°C	41
Figura 3.21 - GC-FID dos epímeros de Pristano na coluna quiral Chirasil Dex. Condições: 70°C (5min) -> 190°C (10min), 1.5°C/min, Split 1/20, Temp. Injector= 260°C, Temp. Detector=270°C	42
Figura 3.22 - GC-FID de uma amostra de Gasóleo Simples na coluna quiral Chirasil Dex. Condições: 70°C (5min) -> 190°C (10min), 1.5°C/min, Split 1/20, Temp. Injector= 260°C, Temp. Detector=270°C	43
Figura 3.23 - Análise sobreposta GC-FID de Gasóleo Simples (Azul) ao Pristano (Vermelho) na coluna quiral Chirasil Dex. Condições: 70°C (5min) -> 190°C (10min), 1.5°C/min, Split 1/20, Temp. Injector= 260°C, Temp. Detector=270°C	44
Figura 3.24 - Sobreposição de cromatogramas GC-FID de Gasóleo Simples (Azul) e Fitano (Vermelho) na coluna quiral Chirasil Dex. Condições: 70°C (5min) -> 190°C (10min), 1.5°C/min, Split 1/20, Temp. Injector= 260°C, Temp. Detector=270°C	44
Figura 3.25 - Recta de calibração do Undecano, regressão linear e coeficiente de correlação	46
Figura 3.26 - Recta de calibração do Pristano, regressão linear e coeficiente de correlação	46
Figura 3.27 - GC-FID do Pristano diluído em água milli-Q (5 ppm, 10 µL) na coluna IL60. Condições: 35°C (5min) -> 260°C (10min), 4°C/min, Splitless, Temp. Injector= 290°C, Temp. Detector=290°C	47

Figura 3.28 - Recta de calibração de Pristano em água (5ppm), equação da regressão linear e coeficiente de correlação	48
Figura 3.29 - GC-FID da Mistura Padronizada de Hidrocarbonetos com os tempos de retenção de C ₁₁ a C ₂₅ (Amostra a 5 ppm, com <i>spike</i> de Pristano) na coluna IL60. Condições: 35°C (5min) -> 260°C (10min), 4°C/min, Splitless, Temp. Injector= 290°C, Temp. Detector=290°C.....	48
Figura 3.30 - Recta de Calibração do Undecano em Mistura Estandardizada, equação da regressão linear e coeficiente de correlação	49
Figura 3.31 - Recta de Calibração do Pristano em Mistura Estandardizada, equação da regressão linear e coeficiente de correlação	49

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 – Algumas colunas de líquidos iônicos Supelco ⁷³	19
Tabela 2.1 – Resumo das condições de utilização das fibras de SPME (recomendações da Sigma-Aldrich)	26
Tabela 2.2 – Métodos Cromatográficos desenvolvidos para análise de hidrocarbonetos em combustíveis, em diferentes fases estacionárias	27
Tabela 4.1 – Parâmetros Analíticos determinados para a metodologia HS-SPME-GC-FID	50

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Designações Anglo-Saxónicas

AED (*Atomic Emission Detector*): Detector de Emissão Atómica
amu (*Atomic Mass Unit*): unidade de massa atómica (Dalton)
ASTM (*American Society for Testing and Materials*): Sociedade Americana de Ensaios e Materiais
Bleeding (tradução: sangramento): Picos com distorção por perda de fase estacionária
BTEX: Grupo de hidrocarbonetos que inclui o Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xilenos (*orto-, meta- e para-*).
CI (*Chemical Ionisation*): Ionização Química
ECD (*Electronic Capture Detector*): Detector de Caputra Electrónica
EI (*Electron Ionisation*): Ionização por Electrões
ESI (*Electrospray Ionisation*): Ionização por Electrospray
eV: electrão-volt, unidade de energia ganha (ou perdida) pela carga de um electrão ao ser sujeito a uma diferença de potencial de um volt.
FAME (*Fatty Acid Methyl Esters*): Ésteres Metílicos de Ácidos Gordos
FPD (*Flame Photometric Detector*): Detector de Chama Fotométrico
Fronting (tradução: Pico com cabeça): Pico com distorção inicial
FT-ICR-MS (*Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry*): Espectrometria de Massa de Ressonância Ciclotrónica de Iões com Transformada de Fourier
GC- FID (*Gas Chromatography with Flame Ionisation Detector*): Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama
GC-MS (*Gas Chromatography with Mass Spectrometry*): Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa
GCxGC (*Comprehensive two-dimensional Gas Chromatography*): Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente
HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*): Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HETP (*Height Equivalent to a Theoric Plate*): Altura equivalente a um prato teórico
HS (*HeadSpace*): Espaço de cabeça
IPD (*Ion-to-Photon Detector*): Detector Ião-para-Fotão
IR (*InfraRed*): Infravermelho
MCP (*Microchannel Plate Detector*): Detector de Placa de Microcanal
m/z (m: massa, z: carga): rácio ou razão massa-carga, uma quantidade física comum em electrodinâmica de partículas com carga (como a espectrometria de massa).
NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*): Ressonância Magnética Nuclear
PAH (*Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*): Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
PASH (*Polycyclic Aromatic Sulfur Heterocycles*): Heterociclos Policíclicos Aromáticos de Enxofre
PEG: PoliEtileno Glicol
RTIL (*Stable Room Temperature Ionic Liquids*): Líquidos Iónicos Estáveis à Temperatura Ambiente
SCD (*Sulfur Chemiluminesce Detector*): Detector de Quimioluminescência de Enxofre
SEC (*Size Exclusion Chromatography*): Cromatografia de Exclusão Molecular
SFC (*Supercritic Fluid Chromatography*): Cromatografia de Fluidos Supercríticos
SIM (*Single Ion Monitoring*): Monitorização Selectiva de Ião.
Split: Com divisão
Splitless: Sem divisão
SPE (*Solid Phase Extraction*): Extracção em fase sólida
SPME (*Solid Phase Micro Extraction*): Microextracção em fase sólida

Tailing (tradução: com cauda): Existência de assimetria na parte traseira de picos cromatográficos produto de vários fenómenos, sendo o mais usual a interacção da matriz/amostra com a fase estacionária da coluna cromatográfica.

TCD (*Thermal Conductivity Detector*): Detector de Condutividade Térmica

TCEP: 1,2,3-Tris(2-CianoEtóxi)Propano

TOF (*Time of Flight*): Tempo-de-vôo

UCM (*Unresolved Complex Mixture*): Mistura complexa não-resolvida

μA: microampere, unidade de corrente eléctrica

μL: microlitro

XIC (*eXtracted-Ion Chromatogram*): Cromatograma com Extracção de Ião

Capítulo 1 – Introdução Teórica

1.1. Enquadramento

Os crimes contra o ambiente são uma adição recente aos códigos penais de vários países; em Portugal, os danos contra o ambiente só são um crime autónomo (ou seja, em que uma acção é punível pelos seus efeitos, mesmo sem criar perigo ou risco para humanos) desde a revisão de 1995 do Código Penal (Decreto-Lei n.º 48/95¹) e as entidades colectivas, como empresas, só podem ser consideradas culpadas de danos contra a natureza desde a 23ª revisão do Código Penal em 2007 (Lei n.º 59/2007²), com a revisão do Artigo 11º: "As pessoas colectivas e entidades equiparadas (...) são responsáveis pelos crimes previstos nos artigos (...) 262.º a 283.º (...)". Ora, os crimes ambientais são tipificados nos artigos 274º (incêndio florestal), 278º (danos contra natureza) e 279º (poluição), encontrando-se nesta recente redacção agora passíveis de serem imputados a empresas com práticas prejudiciais para o ambiente.

No que diz respeito ao Direito Penal Internacional, um dos ilícitos referidos - entre outras tipificações - pela Directiva 2008/99/CE³ (transposta para o Código Penal Português através da Lei nº 56/2011⁴, que altera os artigos 274º, 278º, 279º, 280º e 286º) Artigo 3º, alíneas a), b) e d), é a poluição de solos e água, através de actividades como a descarga, recolha, transporte ou exploração de instalações que contenham substâncias perigosas para o ambiente, e que devem ser punidas como uma infracção penal, quando se verificar existência de dolo ou negligência grave.

No Direito Português, refira-se o artigo 278º, alíneas 1b) e 1c) do Código Penal²: “Destruir ou deteriorar significativamente *habitat* natural (...)” e “Afetar gravemente recursos do subsolo”. Apesar do âmbito geral da lei se focar no dano directo e indirecto da fauna e flora, os derrames causam danos muito graves, por vezes irreversíveis, para o solo e águas subterrâneas, e esta tipificação abrange também estes crimes.

No âmbito de qualquer tipificação penal e inclusivamente de processos cíveis, é necessário determinar o grau de culpa e qual o sujeito que praticou o ilícito, o que implica uma investigação que inclua peritagem. No que diz respeito aos crimes ambientais, pela sua recente presença no código penal, estão sendo descobertos ilícitos que foram praticados no passado^{5,6}; a informação sobre a responsabilidade da empresa ou indivíduo que actualmente explora(m) o terreno contaminado, alheio ou responsável pela poluição, é absolutamente imprescindível.

É, assim, fundamental que se desenvolvam métodos que permitam detectar e datar a presença de compostos poluentes no solo e/ou água, para discernir acerca da ocorrência de ilícito e quem deve ser punido pelo mesmo.

O objectivo inicial desta dissertação foi a caracterização de biomarcadores geoquímicos orgânicos em solos e águas subterrâneas. O estudo envolveu a aplicação da microextração em fase sólida (SPME) a amostras de solos e água contendo hidrocarbonetos e a selecção e avaliação de fases estacionárias adequadas à sua separação cromatográfica gasosa (GC) de diferentes hidrocarbonetos. Foram estudadas as (des)vantagens da utilização de colunas de líquidos iónicos na análise destas matrizes, tendo sido utilizada conjuntamente uma coluna cromatográfica quiral na identificação e estudo dos marcadores geoquímicos mais adequados à datação de derrames.

A utilização da microextração em fase sólida (SPME) como método de preparação de amostra possui vantagens claras ao nível de implementação em equipas técnicas que lidam com grandes números de amostras de origem forense⁷, face às tradicionais extracções sólido-líquido ou líquido-

líquido, motivo que sustentou o desenvolvimento e a validação do método analítico desta dissertação com interesse no contexto de crimes ambientais.

As colunas de líquidos iônicos, um dos mais recentes avanços na tecnologia da cromatografia, têm sido estudadas pela sua discriminação eficaz para com hidrocarbonetos lineares e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos⁸, tornando potencialmente vantajosa a sua utilização em biomarcadores geoquímicos.

1.2 – Petróleo: Derrames e escorrências de combustíveis

O termo Petróleo⁹, derivado do termo latino para "óleo de pedra" (*petra oleum*), é comumente utilizado para designar os produtos derivados da refinação do crude (Figura 1.1¹⁰), mas também o crude não-processado que ocorre naturalmente.

Tradicionalmente, o seu uso remonta já às civilizações pré-babilônicas, há cerca de 5000 anos. O vale Tigre-Eufrates providenciava betume (ou asfalto, termos que na altura se confundiam) para as civilizações suméria e acadiana utilizar na construção.¹¹ Mesmo na Bíblia (Gênesis 6:14), referindo-se à construção da Arca de Noé, existe a descrição que o betume era utilizado como material selante e impermeável. Os seus relatos como fonte de energia remontam também aos tempos bíblicos, um "óleo extraído da pedra" (Deuteronómio 32:13) que era utilizado para acender lamparinas. Já os Gregos, adaptaram as capacidades voláteis de um derivado do petróleo (supõe-se que seja nafta) às batalhas navais, nomeadamente em Constantinopla.¹¹ No século I, os árabes começaram a criar métodos para destilar o petróleo, separando compostos de guerra daqueles com uso medicinal. Considera-se que a era moderna da destilação do petróleo surgiu em 1862, com técnicas de destilação atmosférica.¹¹



Figura 1.1 – Petróleo não refinado (crude)¹⁰

De acordo com a *American Society for Testing And Materials* (ASTM), o petróleo é uma mistura de hidrocarbonetos de origem natural, geralmente no estado líquido, que pode incluir também compostos de enxofre, azoto, oxigénio, metais e outros elementos.¹² É formado pela deposição de algas, fósseis e outros organismos em decomposição, por baixo de rochas sedimentares, onde é exposto a calor e pressões elevadas.

O petróleo não é um produto homogêneo, dependendo a sua composição e características dos locais onde é formado; não só os elementos residuais (como o azoto, oxigénio, enxofre, água e sais) variam de acordo com o local como também os hidrocarbonetos maioritários (e.g. petróleos parafínicos, nafténicos, aromáticos, etc). Desta forma, os processos utilizados para a refinação do petróleo podem variar de acordo com as suas características físico-químicas.¹²

O tratamento do petróleo é feito maioritariamente por processos de destilação, dando origem a produtos (designados por fracções) de composição diferente, tendo maioritariamente em consideração a massa molecular e o ponto de ebulição dos seus compostos maioritários.¹³ A refinação inclui uma destilação inicial que requer apenas o aquecimento do petróleo, separando os compostos mais leves dos mais pesados. Posteriormente, os diferentes produtos podem sofrer destilações a diferentes pressões de modo a melhorar a separação (por exemplo, a separação do asfalto do óleo combustível residual), ou serem sujeitos a processos catalíticos (como a conversão de combustíveis pesados em gasolina) tais como a hidrogenação catalítica (geralmente utilizado em petróleos com predominância

de contaminantes ou hidrocarbonetos policíclicos aromáticos), a isomerização (e.g. nafta com baixas octanas para gasolina com elevadas octanas, ou butano a isobutano) ou a alquilação (nomeadamente em combustíveis de aviação, para obter isoparafinas).¹¹

A refinação do petróleo é baseada maioritariamente em processos fisicoquímicos, mas outros métodos mais recentes focam-se na utilização de processos biotecnológicos utilizando microorganismos para evitar a aplicação de condições extremas (hidrodessulfurização, tratamentos com pressões e temperaturas elevadas, entre outros) de extracção, recuperação e refinação do petróleo.¹³ A utilização de microorganismos permite um vasto número de alterações químicas ao petróleo original. Os processos de extracção primária com pressão natural retiram cerca de 20% do petróleo disponível, e métodos mais caros (secundários e terciários) de injeção de água, utilização de polímeros de ciclodextrina, surfactantes, entre outros, conseguem recuperar mais cerca de 50%, mas estima-se que a quantidade não-recuperável de petróleo nos EUA seja de 58%.¹⁴ A recuperação facilitada por microorganismos possui um custo mais baixo que qualquer uma das técnicas artificiais, com taxas de recuperação iguais ou mais elevadas, e em muitos casos limitando os processos posteriores de tratamento do petróleo, como através da utilização de bactérias dessulfurizantes ou desnitrilantes ou a diminuição da viscosidade das reservas através de bioconversão do crude *in situ*; contudo, a aplicação de microorganismos à extracção, recuperação e transformação do petróleo está ainda em investigação e desenvolvimento. No entanto, é expectável que petróleos transformados com recurso à biotecnologia possam apresentar perfis cromatográficos distintos, ou seja composições químicas distintas, o que levará à necessidade de estudo de (novos) biomarcadores geoquímicos.¹⁴

Para além da óbvia importância do petróleo como matéria-prima para a indústria, nomeadamente na produção de polímeros/plásticos, e também da energia, a indústria de produção e refinação está sujeita a grandes pressões devido ao crescente aumento de consumo por parte dos países fora da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE), que aumentaram cerca de 40% o seu consumo entre 2000 e 2010.¹⁵ As necessidades do aumento de produção e a maior quantidade de navios petrolíferos a transitar nos oceanos, têm originado alguns acidentes de dimensões catastróficas, incluindo os derrames de hidrocarbonetos em ecossistemas marinhos; dois exemplos memoráveis foram os derrames do petroleiro *Exxon Valdez*¹⁶ em 1999, ou da plataforma BP *Deepwater Horizon*¹⁷ em 2011, tão conhecidos do público em geral, devido aos seus imensos danos ambientais.

O método principal escolhido para o tratamento dos efeitos dos derrames foi a biorremediação¹⁸, um método que estimula o sistema microbiano natural da água do mar envolvendo-o na biodegradação aeróbia e anaeróbia, utilizando a adição de fertilizantes com variados nutrientes para diminuir as limitações metabólicas das bactérias. A dispersão (natural e com agentes químicos) das colunas de óleos também permitiu/vem permitindo acelerar a biodegradação. Por exemplo, neste tipo de derrames constatou-se que as amostras colhidas na costa e no solo perto dos locais dos acidentes não continham hidrocarbonetos aromáticos como o benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX), compostos rapidamente degradados por bactérias e também por foto-oxidação, devido à sua baixa massa molecular e curto comprimento da cadeia carbonada. No caso do acidente do *Exxon Valdez*, a maioria do crude presente na superfície da água e praias foi removida em trabalhos de limpeza e devido a tempestades de inverno no primeiro ano.¹⁹ No entanto, apesar da ausência dos BTEX, uma grande parte dos hidrocarbonetos mais pesados foi absorvida por sedimentos mais profundos, persistindo até hoje e, entretanto, libertando hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) e derivados degradados (como os fenantrenos, acenaftileno, fluoroanteno, entre muitos outros) para o ambiente.

Tendo em conta a combinação das características específicas da zona em que o derrame aconteceu, foi possível desenvolver métodos baseados no perfil de PAHs para avaliar não só a toxicidade para o ambiente marinho, bem como a evolução da degradação do petróleo, e ainda

desenvolver um modelo que tem permitido identificar o *Exxon Valdez* como a fonte de contaminação inequívoca nas prospekções posteriores que têm vindo a detectar a presença de petróleo em solos do Alasca.²⁰

A acrescentar aos mediáticos derrames em oceanos, existem também as fugas de material combustível em várias e diferentes tipos de zonas de armazenamento, tais como depósitos de indústrias e/ou oleodutos, geralmente de longa duração, e apenas detectadas aquando dos excessivos volumes das fugas ou em caso de incêndios. Um dos maiores acidentes desta década ocorreu em Little Buffalo, na Província de Alberta no Canadá, em 2011, onde se estima que tenham sido derramados cerca de 4.5 milhões de litros de crude para o solo. A degradação do oleoduto, falta de manutenção e falhas na activação dos protocolos de segurança foram apontadas como sendo as causas do despejo; a empresa exploradora foi considerada responsável por crimes ambientais.²¹

Também na zona de Alberta encontram-se as principais reservas mundiais de areia betuminosa - a mistura de betume (matéria viscosa e semi-sólida presente em depósitos de crude) naturalmente ocorrente com areia, água e terra argilosa; a sua exploração pode gerar um significativo impacto ambiental⁽¹⁾, pois produz mais 12% de gases com efeito estufa por barril do que a produção tradicional de derivados do petróleo.²²

Em média, considera-se que ocorrem cerca de 500 derrames de crude e outros hidrocarbonetos, de oleodutos e reservatórios, por ano nos Estados Unidos (o maior produtor mundial de petróleo e seus derivados), totalizando cerca de 11 milhões de litros de crude despejados no solo, lagos e reservas de águas subterrâneas, reportados à *Pipeline and Hazardous Materials Safety Administration* (PHMSA).²³ No entanto, não são só os países produtores e exportadores de petróleo que são afectados por estes acidentes, como, por exemplo, provaram os acidentes do petroleiro *Coral Bunker* no ano 2000²⁴, em Viana do Castelo (Portugal), e do petroleiro *Prestige* em 2002²⁵, no Cabo de Finisterra (Espanha), que produziram alterações à fauna e flora marítimas desde o norte de Espanha até ao norte de Portugal.

1.3 – Biomarcadores geoquímicos e sua relevância

Em termos latos, biomarcador é definido como sendo “uma característica que é objectivamente medida e avaliada como um indicador dos processos biológicos normais, processos patológicos, ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica”.²⁶ Esta definição aplica-se maioritariamente ao contexto biomédico e aos marcadores bioquímicos. No entanto, quando utilizada para se referir aos biomarcadores geológicos, como no caso do petróleo, a palavra biomarcador refere-se a hidrocarbonetos complexos derivados da degradação e decomposição de seres vivos depositados sob o solo.²⁷

No caso do petróleo, os biomarcadores geológicos permitem a avaliação de diferentes quesitos: contaminação e falsificação dos produtos comerciais, origem e datação de derrames e efeitos biológicos e persistência no ecossistema, grau de biodegradação, fonte de produção do crude, para além dos interesses industriais, tais como a avaliação da rentabilidade de um depósito petrolífero e qualidade, fenómenos de migração e avanço/avaliação dos processos de biorremediação.

No caso das análises químicas ambientais forenses, a generalidade dos biomarcadores seleccionados são compostos resistentes à degradação (Figura 1.2), contrariamente a hidrocarbonetos de baixo peso molecular tais como alcanos ou alguns aromáticos, que permanecem pouco tempo no ecossistema antes de sofrerem alterações.²⁸

⁽¹⁾ Impacte Ambiental – expressão escrita de acordo com a grafia descrita pela Agência Portuguesa do Ambiente.

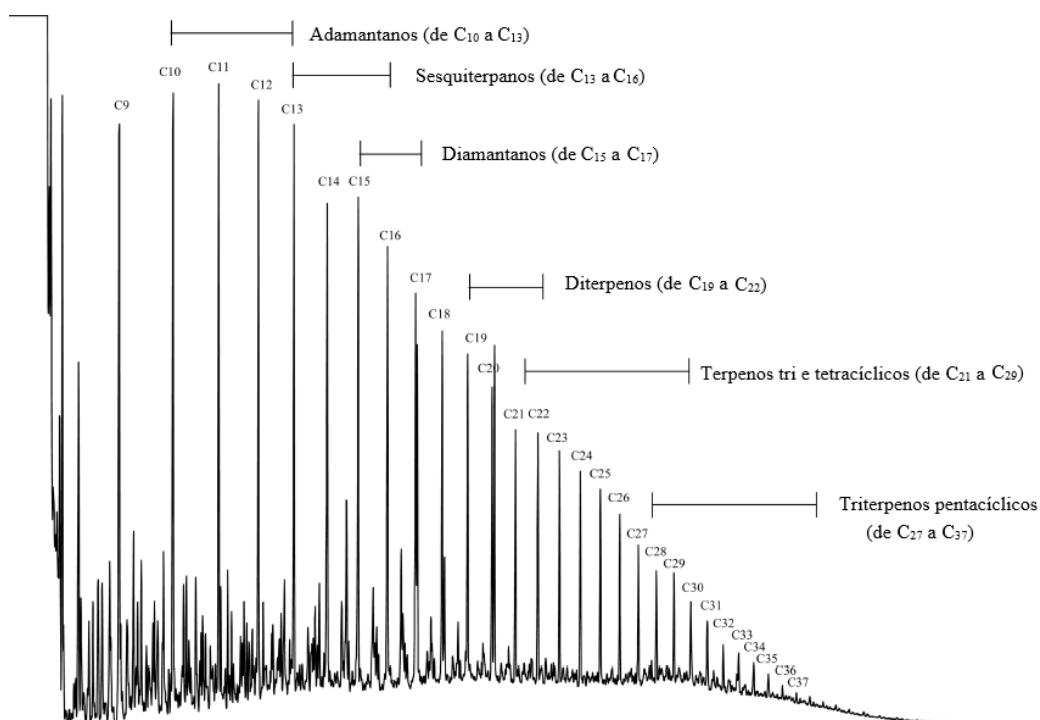


Figura 1.2 - Cromatograma, obtido por Cromatografia Gasosa com Detecção por Ionização de Chama (GC-FID), de hidrocarbonetos e biomarcadores mais usuais (Adaptado de Wang et al²⁷)

A caracterização dos principais grupos de biomarcadores tem sido efectuada por Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa (GC-MS) usando alguns fragmentos moleculares (e.g. m/z 83 para alquil-ciclohexanos, m/z 123 para sesquiterpenos, m/z 191 para terpenos, entre outros)²⁷, que permitem a localização e identificação dos marcadores em amostras complexas contendo hidrocarbonetos, bem como distinguir os tipos de derivados de petróleo pela quantidade relativa dos seus biomarcadores; um exemplo é a distinção entre hidrocarbonetos combustíveis e lubrificantes de elevada massa molecular. Os esteranos (derivados do ciclopentanoperhidrofenantreno, Figura 1.3) triaromáticos (m/z 231) e monoaromáticos (m/z 253) são dois dos grupos com importância forense, devido a possuírem diferentes processos de produção e consequentemente darem origem a diferentes quantidades de esteranos.²⁷ A análise por Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama, ou GC-FID (Figura 1.2), permite também uma avaliação rápida da presença qualitativa dos biomarcadores mais comuns.

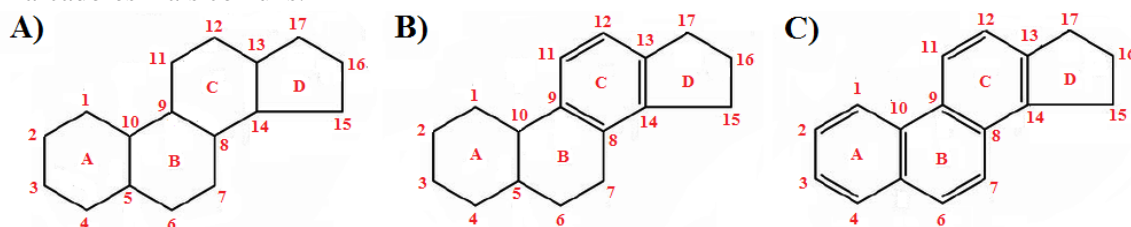


Figura 1.3 – Estrutura geral dos A) Esteranos, B) Esteranos Monoaromáticos (de anel C) e C) Esteranos Triaromáticos

Após a análise experimental e química, a análise estatística multivariável é importante na determinação da correlação dos biomarcadores com as fontes de origem. Uma das aplicações é o estudo da correlação de diferentes marcadores com os locais de extracção e desvendar a origem de um despejo ou contaminação. Muitas vezes, diferentes combustíveis ou lubrificantes podem apresentar

perfis cromatográficos semelhantes em análise por GC-FID, mas uma quantificação de biomarcadores bastante diferente (por exemplo, o diesel apresenta uma distribuição gaussiana dos hidrocarbonetos lineares, mas diferentes quantidades relativas de ramificados e aromáticos consoante a sua origem).²⁸ A utilização de rácios tem sido preferencial em comparação a valores individuais de biomarcadores, por possuírem um efeito auto-normalizante (elimina erros e efeito de matriz: interferências ou discrepâncias produzidas por interações dos restantes componentes de uma amostra que não os analitos de interesse); a maioria deles não é influenciada por alterações na refinação e extracção e demonstra menos alteração ao longo do tempo. Três dos rácios mais comuns para datação e determinação de biodegradação têm sido os rácios pristano/fitano, pristano/*n*-C17 e fitano/*n*-C18.²⁹ Para além destes biomarcadores mais comuns, tem sido ainda necessário considerar os biomarcadores únicos, compostos com ocorrência geológica e biológica rara, e, portanto, com a capacidade de classificar origens muito específicas de petróleo (e.g.: botriococano, Fig. 1.4).³⁰

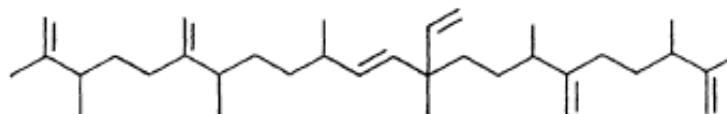


Figura 1.4 - Botriococano produzido pela alga *Botryococcus braunii* (Adaptado de Moldowan et al³⁰)

A degradação ambiental de hidrocarbonetos ocorre através de sete principais mecanismos: evaporação, emulsificação, dispersão, dissolução, degradação microbiana, foto-oxidação e processos geológicos. Nas fracções mais leves do petróleo (caso da gasolina), devido aos baixos pontos de ebulição dos hidrocarbonetos, a evaporação é o processo dominante.³¹ A gasolina mostra de forma proeminente a alteração do seu perfil de hidrocarbonetos mais leves relativamente ao dos hidrocarbonetos mais pesados (Figura 1.5). A velocidade e tipo de degradação que ocorrem em cada derrame são influenciados pela composição do crude, pelo local do derrame e seu ambiente microbiológico, havendo alterações muito distintas ao perfil químico inicial (geral) dos derivados do petróleo. No entanto, os compostos escolhidos como biomarcadores estão entre os que permanecem mais tempo inalterados, possuindo geralmente massas moleculares mais elevadas.³² Todos estes factores, especialmente a biodegradação, contribuem para incertezas na datação dos derrames, motivo pelo qual ainda não existem métodos inequívocos aplicáveis.

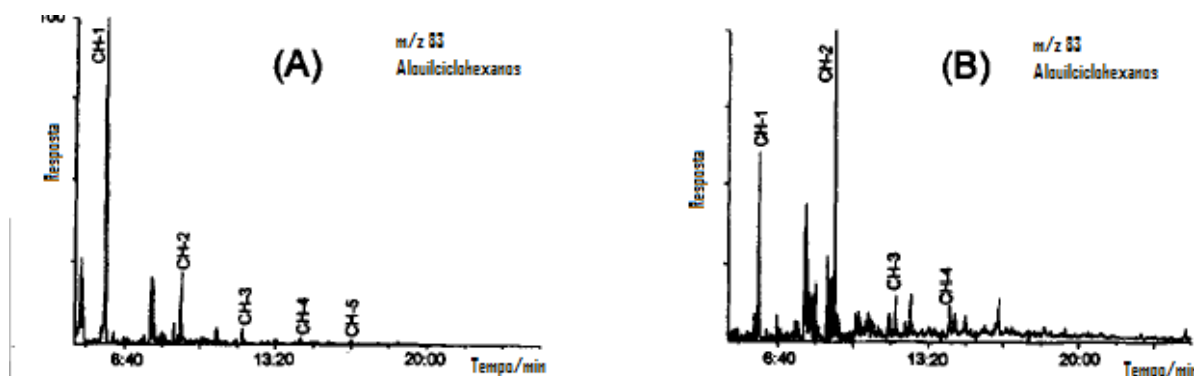


Figura 1.5 – Perfis de monitorização de ião selectivo(SIM)-GC-MS (*m/z* 83) de gasolina não degradada (A) e gasolina moderadamente degradada (B) (Adaptado de Kaplan et al²⁹)

A distinção entre hidrocarbonetos de origem pirogénica, petrogénica e biogénica também tem sido feita quer pela utilização de biomarcadores, como pela avaliação da presença ou ausência de mistura complexa não resolvida (UCM, *Unresolved Complex Mixture*), e ainda pelas quantidades relativas de diferentes *n*-alcanos e outros biomarcadores tais como sesquiterpenos e hopanos. Esta distinção permite avaliar correctamente os efeitos de um derrame num ecossistema e postular a origem dos hidrocarbonetos encontrados; por exemplo, os de origem biogénica (fauna e flora), não possuem UCM, têm uma maior quantidade relativa de *n*-alcanos de número ímpar de carbonos, entre C₂₁ e C₃₃, e podem possuir quantidades superiores de pristano em relação ao fitano (geralmente um perfil associado a ambientes marinhos com presença de fitoplâncton³³); os de origem petrogénica (e.g. resultantes de um derrame), quase sempre apresentam UCM no perfil analítico e um rácio diferente de *n*-alcanos com a usual distribuição gaussiana.²⁸ Esta distinção permite avaliar o sucesso de esforços de biorremediação, bem como determinar zonas de costa atingidas por derrames oceânicos.

Para além da distinção da génese dos hidrocarbonetos, os biomarcadores permitem-nos também distinguir entre origem geográfica e matriz de origem. Como já foi referido no sub-capítulo 1.2 (página 4), a zona de Alberta no Canadá possui enormes reservas de areia betuminosa. Esta tem diferenças em relação ao crude de perfuração, não só na textura e contaminações, mas também na composição, diferenças essas muito claras, e, portanto, visíveis em cromatografia gasosa. Na sua análise demonstra-se a importância da utilização de biomarcadores na distinção das (diferentes) matrizes originárias do crude.

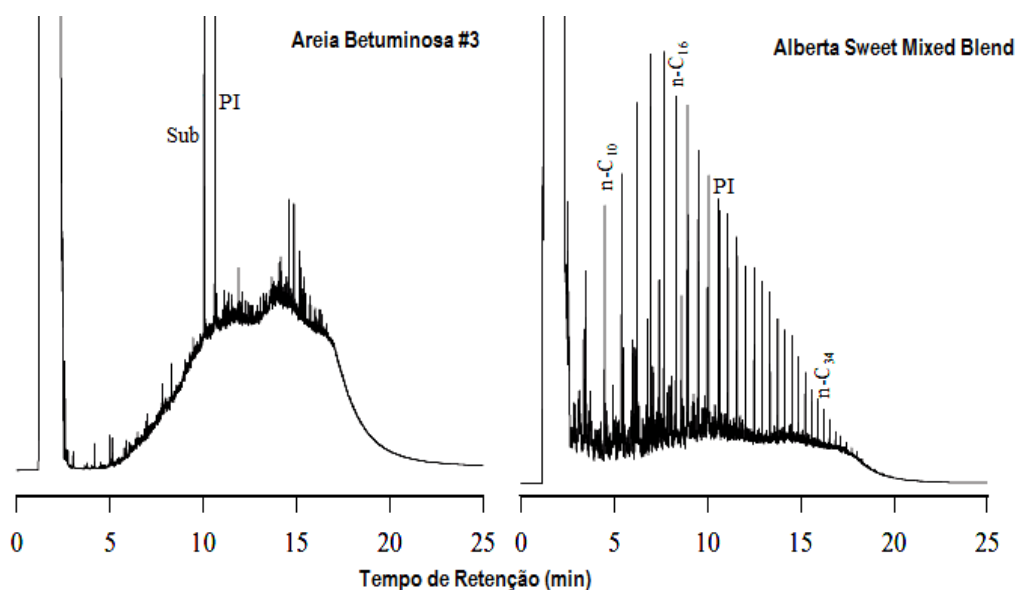


Figura 1.6 – Traçados analíticos GC-FID da zona geográfica de Alberta, Canadá: A) Areia betuminosa e B) Mistura de hidrocarbonetos (tradicional) extraída por métodos convencionais (*Alberta Sweet Mixed Blend*) (Adaptado de Yang et al²²) Sub: Padrão Substituto (*Surrogate Standards*: *o*-terfenil, naftaleno, acenaftaleno, fenantreno, benz[a]antraceno e perileno deuterados), PI: Padrão Interno (Mistura para quantificação de hidrocarbonetos saturados, aromáticos e PAHs)

Uma das características da areia betuminosa é, na sua análise, a presença de uma mistura complexa não-resolvida (UCM) entre C₁₀ e C₄₀ (Figura 1.6).²² A presença analítica de UCM está relacionada maioritariamente com processos de biodegradação; para além de ser considerada tóxica para o ambiente, a sua existência e prevalência têm sido também utilizadas como biomarcador para avaliação/detecção da sua origem³⁴ - a Figura 1.6 ilustra a diferença entre a areia betuminosa e a amostra proveniente de um reservatório petrolífero da mesma zona geográfica.

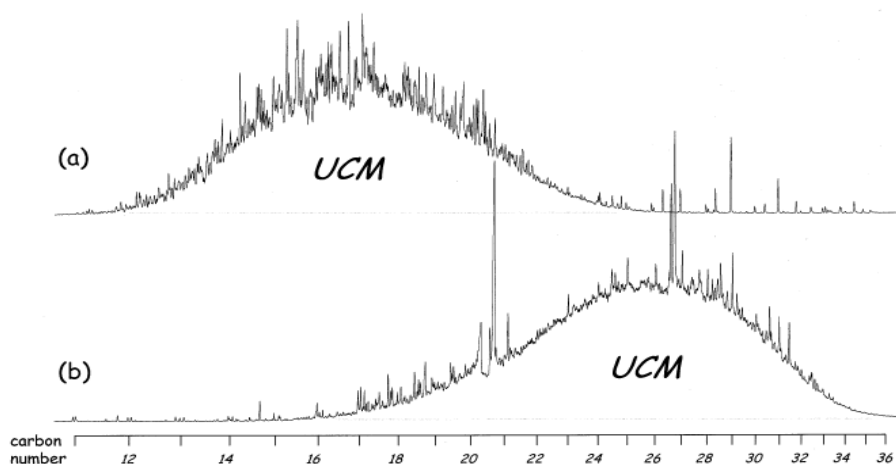


Figura 1.7 – Utilização analítica da presença de UCM em extractos de solo como biomarcadores de zona geográfica: a) Wild Harbor River e b) Narragansett Bay (Adaptado de Frysinger et al³⁴)

Conforme ilustrado nas Figuras 1.6 e 1.7, o termo UCM descreve a presença de uma "lomba" (*hump*) no cromatograma, a qual não pode ser separada pela técnica analítica; apesar da impossibilidade de resolução e distinção dos seus constituintes individuais (geralmente cicloalcanos e alcanos ramificados), as UCM possuem características que as tornam biomarcadores, uma vez que os seus tempos de retenção e forma podem ser específicos de determinados ambientes geoquímicos.³⁴

A utilização de técnicas analíticas mais recentes, tais como GCxGC (Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente) para resolver cromatograficamente as UCM (e.g.: coluna aquiral numa dimensão e quiral noutra) têm sido descritas para a determinação de contaminações ambientais, mas ainda assim não têm sido capazes de separar totalmente as UCM³⁴, motivo pelo qual a utilização da UCM como biomarcador não tem sido generalizada a todas as análises ambientais; pelo contrário, a presença de hopanos, terpenos e sesquiterpenos tem sido mais útil na identificação de hidrocarbonetos petrogénicos.

1.4 - Determinação analítica de biomarcadores geoquímicos

1.4.1 - Preparação de amostra

A Microextracção em Fase Sólida (SPME) é um método de preparação de amostra que utiliza uma fibra de sílica fundida coberta com uma fase orgânica polimérica para a extracção (selectiva) de compostos, baseada maioritariamente no princípio de partição e equilíbrio multifase, em que os compostos a serem analisados atingem o equilíbrio entre a fibra/fase estacionária da SPME, sendo a sua desadsorção ou desabsorção geralmente feita termicamente no injector do cromatógrafo gasoso.³⁵ Este princípio de funcionamento permite que com o mesmo equipamento se efectuem a extracção e a concentração, e posteriormente a desadsorção/desabsorção dos componentes da amostra no injector do cromatógrafo, eliminando a necessidade de passos adicionais ou aplicação de solventes. A fibra está inserida num suporte análogo a uma seringa (*holder*) cuja estrutura permite a exposição e armazenamento da fibra dentro da agulha utilizando um *slider*, permitindo penetrar septos de silicone sem danificar a fibra (Figura 1.8).

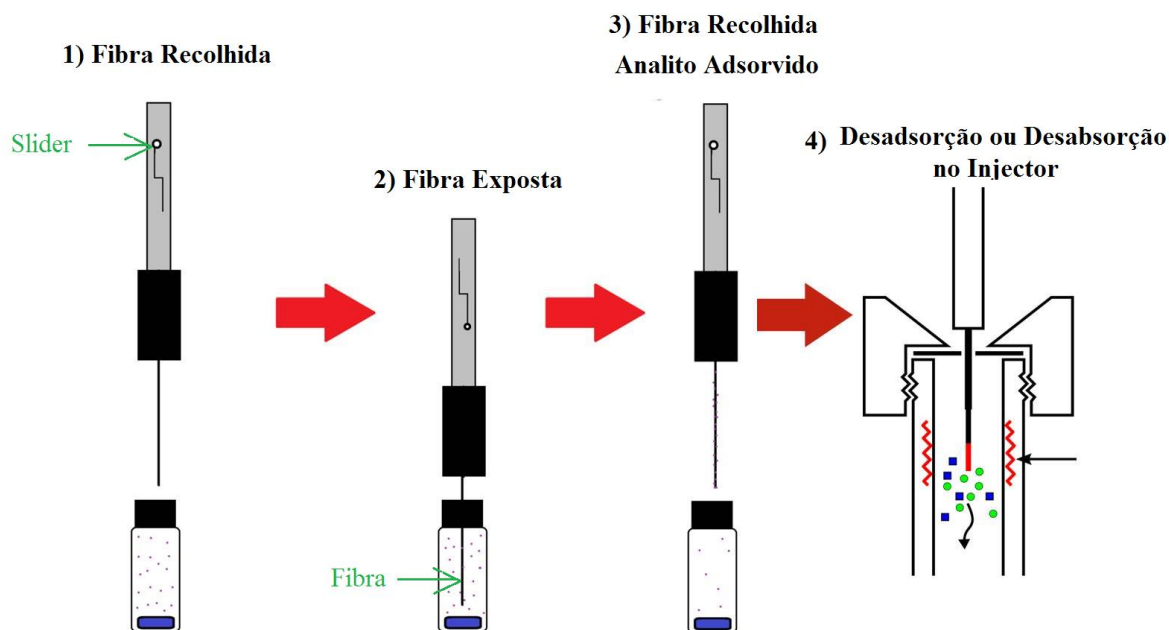


Figura 1.8 – Ilustração da utilização de SPME como método de preparação de amostra

A utilização da SPME inicia-se com a fibra recolhida dentro do *holder*, utilizando-se a ponta metálica para penetrar o septo do recipiente com a amostra (1). De seguida, deslizando o *slider* no sentido descendente a fibra é exposta à amostra, durante o tempo desejado (2); recuando o *slider* para a posição original, a fibra recolhe, para então se retirar de forma segura – deixar a fibra exposta ao atravessar o septo irá provocar a sua degradação ou fractura (3). O passo final consiste na exposição da fibra no injector do cromatógrafo, para que ocorra a desadsorção/desabsorção térmica da amostra (4) e a sua subsequente análise cromatográfica.

Existem vários modos de extracção (e.g.: *headspace* ou imersão directa), e em cada um deles o equilíbrio é atingido de forma distinta; a retenção dos compostos é afectada pelo tipo de fibra e natureza química dos mesmos. O modo *headspace* (espaço de cabeça, HS) é o mais usado para compostos moderadamente ou muito voláteis; a fibra é colocada na zona superior do recipiente contendo a amostra (sólida ou líquida; fase volatilizada desta) verificando-se a retenção de compostos na fibra. A utilização de aquecimento/temperatura para ajudar a volatilização permite também uma melhor difusão e homogeneidade da fase volatilizada da amostra. Na aplicação da HS-SPME a hidrocarbonetos BTEX, os tempos de equilíbrio para a extracção são muito baixos, o que permite maior eficiência temporal em relação à imersão directa (de 5 minutos para 1 minuto em alguns casos).³⁵ No caso de hidrocarbonetos de elevada massa molecular, como os PAH, o tempo de equilíbrio aumenta, pode exceder uma hora, o que é necessário ter em conta para definir o método de preparação de amostra. A cinética da extracção HS-SPME é dependente do volume de *headspace* e tempo de equilíbrio; com tempos de exposição de fibra muito curtos, os analitos são extraídos da fase gasosa, a custo da perda de sensibilidade.

O modo de imersão directa (DI) é mais utilizado com compostos pouco voláteis ou termolábeis; nele a fibra é colocada em contacto com a amostra na fase líquida. É necessário considerar que, sendo a matriz complexa, podem existir fenómenos de volatilização que alterem a composição química ou que a presença de compostos maioritários interfira com a extracção.³⁶

O método de HS-SPME está descrito em múltiplas publicações como a metodologia adequada para a análise de hidrocarbonetos em matrizes aquosas ou amostras líquidas, não sendo muito utilizada em amostras de solo, sendo preferidas a extracção líquida pressurizada, a extracção líquida subcrítica, a extracção em fase sólida (SPE) ou os métodos mais tradicionais como Soxhlet^{37,38,39}; no caso de análise de extratos aquosos de solos, o método SPE é o mais comum e difundido⁴⁰, embora a SPME associada a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)⁴¹ e Cromatografia de Fluídos Supercríticos (SFC)⁴² tenha vindo a popularizar-se. A diversidade de fibras disponíveis e a especificidade da matriz de solo, evidencia a necessidade do desenvolvimento de uma metodologia para utilização no local de amostragem. Tratando-se de uma técnica de fácil manuseamento, a SPME tem vindo a demonstrar-se como uma boa escolha, podendo futuramente valorizar-se face às existentes complexas e demoradas alternativas de amostragem; terá como desvantagem o tempo de vida das fibras (especialmente se operada nas condições limite estipuladas pelos fabricantes).⁴³

Existem três tipos de fibras: polares, não polares e bipolares. Incluídas nas polares estão as fibras de Poliácrlato e Carbowax/Polietileno Glicol. As fibras de Polidimetilsiloxano (PDMS) são as únicas consideradas como não-polares (Figura 1.9); as variantes Carboxen-Polidimetilsiloxano (CAR/PDMS), Divinilbenzeno-Carboxen-Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS ou fibra tripla) e Polidimetilsiloxano-Divinilbenzeno (PDMS/DVB) são tidas como bipolares, ou seja, indicadas para compostos de diversas polaridades.⁴⁴ (Figura 1.10)

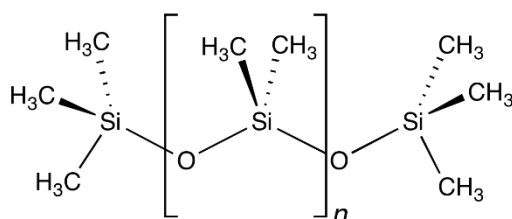


Figura 1.9 - Polidimetilsiloxano (PDMS)

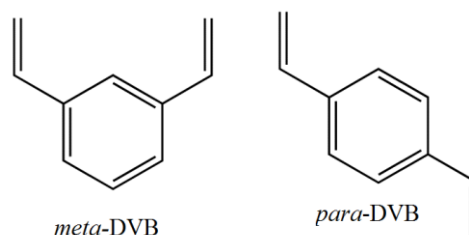


Figura 1.10 – Divinilbenzeno (DVB; a denominação comercial DVB inclui ambos os isómeros *meta* e *para* em proporções variáveis dependendo do fabricante)

A composição das fibras determina a sua selectividade para os analitos; por exemplo, o Carboxen trata-se de uma peneira molecular de carbono (possui uma estrutura porosa derivada da pirólise de um precursor polimérico), que permite aumentar a adsorção e desadsorção de *n*-alcanos de baixo peso molecular.⁴⁵ De notar que o equilíbrio é afectado pelo diâmetro da fibra; a equação $n = (Kfs \times Vf \times Vs \times C0) / (Kfs \times Vf + Vs)$ (em que *n* - massa de analito extraída, *Kfs* - coeficiente de distribuição, *Vf* - volume da superfície da fibra, *Vs* - volume da amostra e *C0* - concentração inicial do analito)⁴⁶ descreve as condições do analito no equilíbrio entre a amostra e a fibra. Devido à influência do volume da fibra na adsorção (ou absorção, dependendo do fenómeno predominante na fibra) dos analitos, existem diferentes diâmetros para as mesmas fases, o que confere diferentes capacidades de retenção dos analitos.³⁵ As fibras podem ser identificadas (e distinguidas) por um código de cores, que representa a fase estacionária, o seu diâmetro e aplicação (GC ou HPLC).

1.4.2 - Métodos Cromatográficos

Cromatografia é o termo genérico aplicado à técnica analítica que visa a separação dos compostos utilizando uma fase estacionária e uma fase móvel. Existem vários tipos de cromatografia, sendo actualmente os mais utilizados, a líquida (HPLC), a gasosa (GC) e a exclusão molecular (SEC).⁴⁷

Na Cromatografia Gasosa (Figura 1.11) a separação de compostos ocorre em fase gasosa, usando temperatura. Os princípios de separação baseiam-se na utilização da fase móvel (um gás de arraste inerte ou não-reactivo: hélio ou hidrogénio) que desloca a amostra ao longo de uma coluna; esta coluna, de vidro ou metal, contém a fase estacionária (polimérica).⁴⁸ O aquecimento em combinação com as características químicas da fase estacionária permite a separação dos compostos, determinada pela interacção com a fase estacionária. A amostra é introduzida no cromatógrafo gasoso através do injector; existem vários tipos de injector, mas o mais comum é o Split/Splitless (S/SL).⁴⁸ Com recurso a microseringas, injecta-se a amostra através de um septo, entrando numa câmara aquecida onde é volatilizada. No modo *splitless*, toda a amostra é arrastada pela fase móvel (gás de arraste) e introduzida na coluna cromatográfica enquanto que no modo *split* há uma divisão e apenas uma parte da amostra é introduzida na coluna, o que permite evitar a saturação da coluna ou do detector com amostras, no caso de elevadas concentrações de analitos.⁴⁹

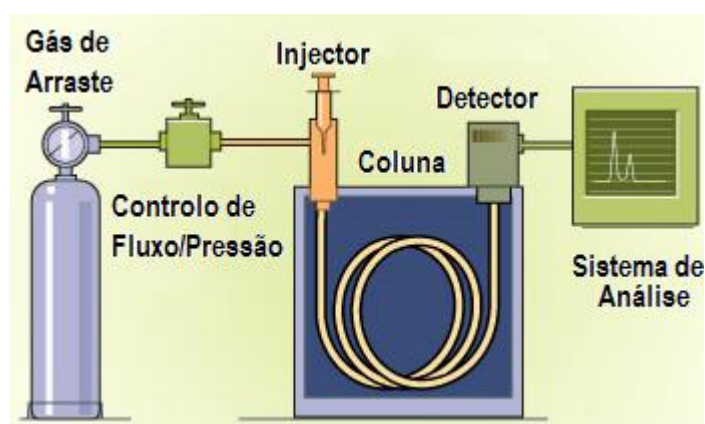


Figura 1.11 - Esquema Geral de um Cromatógrafo Gasoso⁴⁹

A fase estacionária afecta a selectividade, sensibilidade e qualidade da separação; regra geral, o principal atributo a ter em conta na selecção da fase estacionária é a polaridade da amostra, bem como os pontos de ebulição dos seus constituintes (analitos).⁵⁰ A capacidade de separação ou eficiência de uma coluna cromatográfica é expressa pela “altura equivalente a um prato teórico” (*Height Equivalent to a Theoric Plate*, HETP), um conceito teórico em que hipoteticamente existe um equilíbrio imediato das moléculas em análise entre as fases estacionárias e móvel numa determinada altura/volume da coluna, sendo que quanto menor esta altura, mais “pratos teóricos” existem na coluna, menos largura de banda existe e por isso mais eficientes são as separações.

Esta eficiência é descrita pela equação de Van Deemter (Figura 1.12), a equação mais importante da cromatografia, que expressa numa função hiperbólica as características físicas, cinéticas e termodinâmicas da separação, relacionando-as com a velocidade linear da fase móvel. Usando a equação de Van Deemter verifica-se que a eficiência máxima ocorre com uma velocidade óptima e altura dos pratos teóricos mínima. A equação é descrita por $HETP = A + (B/u) + Cu$, em que A é o parâmetro de difusão de Eddy (caminhos que uma molécula pode viajar numa coluna, sendo considerada zero em colunas não empacotadas), B é o coeficiente de difusão longitudinal (ou difusão molecular causada pela diferença de concentrações entre zonas da coluna), C a resistência à transferência de massa (cinética dos processos de transferência entre as fases estacionária e móvel) e u a velocidade linear da fase móvel.⁴⁸

Disto deriva que as condições da fase estacionária, como as dimensões da coluna (comprimento, diâmetro interno e dimensão do filme da fase estacionária) afectam a separação e o tempo de análise, entre outros parâmetros, que surgem em mais detalhe em expansões da equação de Van Deemter.

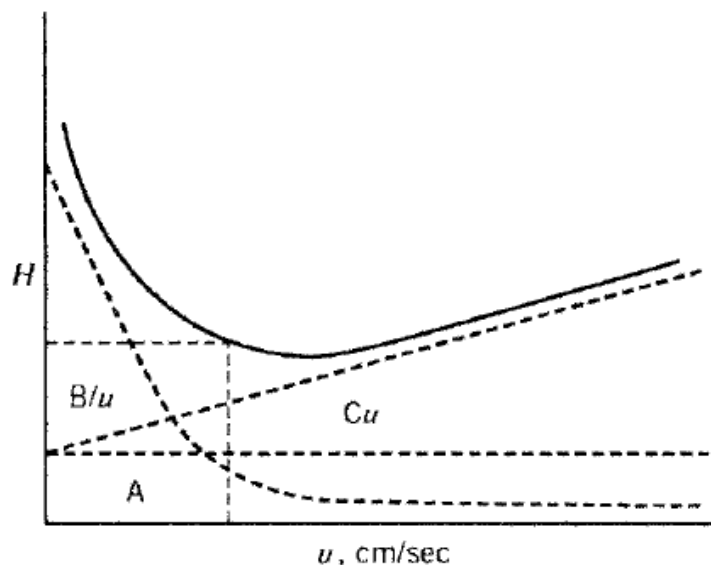


Figura 1.12 – Representação da equação de Van Deemter - $HETP = A + (B/u) + Cu$. Os tracejados representam as diferentes variáveis da equação, a hipérbole representa a equação. $H=HETP$. (Adaptado de Grob et al⁴⁸)

Seguidamente à separação, o sistema de detecção na cromatografia gasosa produz um sinal (cromatograma) ilustrando a separação conseguida; a amostra separada é continuamente detectada em bandas (picos cromatográficos). Existem diferentes tipos de detectores tendo em conta as diferentes características físico-químicas dos compostos químicos. Alguns exemplos são o Detector de Chama Fotométrico (FPD), Detector de Emissão Atómica (AED), Detector de Captura Electrónica (ECD), Detector de Condutividade Térmica (TCD), Detector por Ionização de Chama (FID), Espectrometria de Massa (MS), entre outros.⁴⁸

A detecção por FID (Figura 1.13) ganhou popularidade devido a produzir uma resposta quase universal aos compostos orgânicos, não reagindo aos gases inertes ou contaminações devidas à presença de água. O seu princípio de funcionamento baseia-se na existência de uma chama alimentada por hidrogénio, onde os compostos arrastados pela fase móvel são submetidos a pirólise.⁴⁹ Existem várias optimizações que permitem aumentar a sensibilidade (relação sinal-ruído) e diminuir o alargamento dos picos, como por exemplo a utilização de um gás suplementar (*make up*), usualmente azoto molecular, na forma de fluxo adicional que permite concentrar a amostra em volta do *jet*, ou compensar a alteração dos fluxos de ar e hidrogénio no detector.

Existem várias reacções a considerar no funcionamento do FID. A primeira, reacção exotérmica de hidrogénio com o oxigénio do ar, origina calor e água, criando a chama de hidrogénio. Quando um analito orgânico passa através da chama, sofre pirólise num ambiente rico em hidrogénio; este, subsequentemente, sofre a seguinte reacção $CH_4 \rightarrow H_2 + :CH^{\bullet} \rightarrow CHO^+ + e^-$, e os iões formilo irão produzir uma alteração à corrente eléctrica (diferença de potencial) entre os dois eléctrodos, o que permite obter alterações ao sinal e traçar um cromatograma com esses valores. Existem outras reacções subsquentes, como a reacção do formilo com a água produzida pela chama ($CHO^+ + H_2O \rightarrow H_3O^+ + CO$), em que o ião hidrónio é o responsável pela produção de sinal. Todos os iões positivos são atraídos para o colector (Figura 1.13), que possui uma carga negativa o que permite evitar a recombinação dos electrões com os catiões formados, garantindo um sinal representativo.⁴⁸

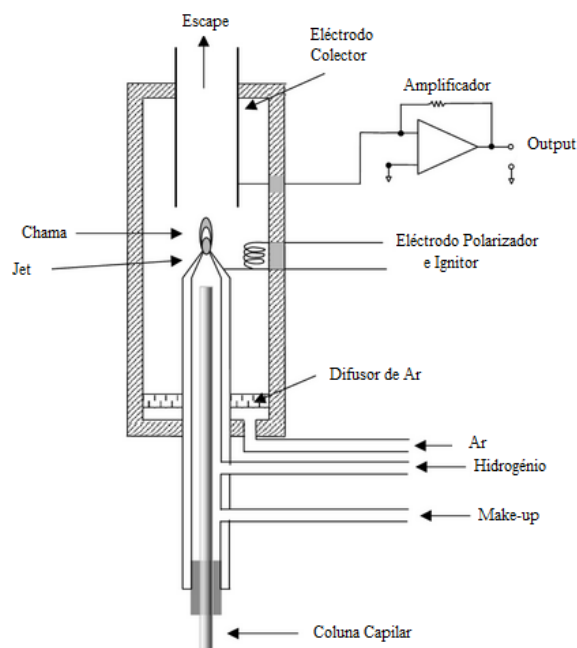


Figura 1.13 - Esquema de um FID (Adaptado de Grob et al⁴⁸)

A técnica de GC-FID tem sido vastamente aplicada com o objectivo de analisar biomarcadores, pela sua universalidade de resposta aos compostos orgânicos. Não existe, no entanto, nenhum método universal capaz de analisar eficientemente as matrizes de crude e derivados, sendo que outros detectores como a Espectroscopia de Infravermelho (GC-IR) e Ressonância Magnética Nuclear (GC-NMR) permitem obter informação adicional que não pode ser obtida através da ionização de chama. Ainda assim, mesmo tendo em conta as limitações do FID, alguns autores consideram que é possível detectar compostos constituintes do petróleo com sensibilidade na ordem dos 10ppm em solo e 50ppb em água.⁵¹ Apesar da detecção por FID não permitir identificações positivas em crudes largamente degradados, a análise de produtos recentes para datação e identificação da origem através da utilização de padrões de alcanos e terpenos é largamente possível, como já apresentado no capítulo 1.3.

Como referido, o FID não é capaz de detectar e analisar todos os tipos de amostra, apesar de ser um dos métodos de detecção mais versáteis. Um dos métodos de detecção mais utilizados para análises mais detalhadas/minuciosas e identificação de amostras complexas é a Espectrometria de Massa (MS), uma técnica de detecção que permite identificar e quantificar compostos numa amostra através da abundância dos iões e da razão massa-carga, iões obtidos através da ionização dos compostos (Figura 1.14).⁵²

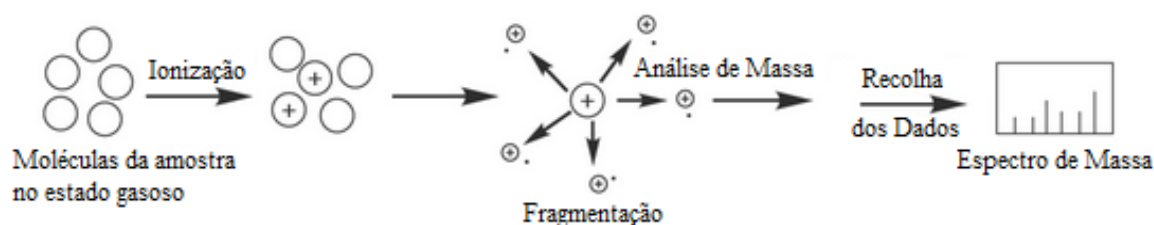


Figura 1.14 – Fundamentos da análise por Espectrometria de Massa (Adaptado de Dass⁵³)

A ionização converte as moléculas dos analitos em fragmentos/espécies com carga (Figura 1.15), através do bombardeamento com electrões ou outras moléculas (no caso da ionização química) ocorrendo a quebra das moléculas de analito em iões fragmento característicos.⁵² Existem variados

métodos de ionização, separados em dois grupos: ionização forte (*hard*) ou branda (*soft*), dependendo da energia utilizada e grau de fragmentação provocado.⁵³ A Ionização por Electrões (EI) é o exemplo mais comum de ionização forte, na qual o aquecimento de um filamento com corrente eléctrica gera electrões que seguidamente são acelerados perpendicularmente às moléculas de analitos; os electrões com energia elevada a baixas pressões causam a fragmentação e ionização das moléculas, criando catiões e/ou radicais positivos que serão conduzidos para o analisador de massas. Apesar de ser o primeiro método de ionização desenvolvido, é o mais comum, e tradicionalmente utilizado com cromatografia gasosa, pois os analitos termicamente estáveis e voláteis e a fase móvel inerte são três condições imprescindíveis para a EI.

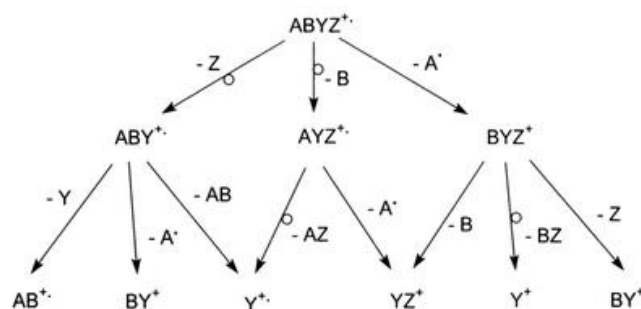


Figura 1.15 - Fragmentações possíveis de uma espécie hipotética $ABYZ$ sob ionização forte (EI) (Adaptado de Gross⁵⁴)

Por outro lado, a ionização branda tem vários exemplos comumente utilizados, como a Ionização Química (CI) que é conseguida por colisão de electrões com um gás reagente e criando um plasma que irá ionizar os analitos, ou a Ionização por Electrospray (ESI), em que uma corrente de alta voltagem é aplicada para criar um aerossol de iões, entre outros.⁵⁴ Seja qual o método de ionização escolhido, os fragmentos produzidos serão reprodutíveis sempre que sujeitos às mesmas condições ideais, o que permite a aplicação do MS para caracterização de moléculas e a constituição de bibliotecas ou bases de dados de identificação a partir dos fragmentos conseguidos usadas para comparação.

Após a ionização, ocorre a separação dos diferentes fragmentos e a sua análise. O analisador de massa separa os iões de acordo com a razão massa-carga, existindo uma variedade de formas de separação, utilizando campos magnéticos ou eléctricos, sejam estáticos ou dinâmicos. No entanto, independentemente do tipo de analito, a separação é sempre governada pelas leis de Lorentz (que relaciona carga e velocidade do ião e as energias de campos magnéticos e eléctricos) e a 2ª Lei de Newton (que relaciona massa com aceleração): o resultado de ambas determina a força exercida no ião e, consequentemente, o seu movimento em função da sua razão massa-carga.⁵⁴ Os analisadores mais comuns hoje utilizados são os de quadrupolo e os de tempo-de-vôo (TOF); o TOF utiliza um campo eléctrico para acelerar os iões com o mesmo potencial, originando partículas do mesmo peso que alcançam o detector com a mesma velocidade⁵⁵, enquanto que o Quadrupolo utiliza frequências de rádio para seleccionar apenas partículas de um determinado m/z a cada momento.⁵⁶ Em ambos os casos, significa que iões lentos e com m/z maiores serão detectados com dificuldade. Outros métodos como armadilhas de iões (*ion traps*)⁵⁶ ou ressonância ciclónica (girofrequência)⁵⁷ permitem ultrapassar algumas das dificuldades que os métodos mais tradicionais possuem.

O último constituinte do MS é o detector; à semelhança do FID, uma alteração de corrente no sistema é registada e permite desenhar o espectro. No entanto, em MS isto é conseguido pela detecção de partículas carregadas ao passarem pelo detector ou atingirem uma superfície.⁵⁴ Tipicamente,

multiplicadores de electrões são utilizados, criando o efeito chamado emissão secundária - ou seja, o impacto de um electrão produz um número maior de electrões a partir de uma superfície metálica, aumentando o número de partículas carregadas que podem ser detectadas.⁵⁸ É uma das técnicas mais antigas de amplificação de sinal, mas que tem bastante sucesso na aplicação à espectrometria de massa. Outro método bastante antigo é a utilização do Copo de Faraday como detector, em que um corpo metálico captura partículas com carga, medindo as alterações de corrente eléctrica para quantificar o número de iões presentes.⁵⁹ Outros métodos, que podem ser utilizados em conjunto com os multiplicadores de electrões, são os detectores de Ião-para-Fotão (IPD), em que os electrões atingem um material cintilante (produtora de fotoluminescência), produzindo fótons, sendo estes que são detectados.⁶⁰ Por oposição, os detectores de Placa de Microcanal (MCP) têm um princípio de funcionamento similar ao multiplicador de electrões, com a diferença que produzem uma amplificação e detecção de sinal numa reacção em cascata, aumentando em várias ordens de magnitude o sinal, antes da detecção utilizando alterações a uma corrente eléctrica fixa.⁶¹ Estas duas técnicas de detecção possuem diferentes características em termos de sensibilidade e adequação a diferentes massas e matrizes.

Uma outra vantagem do MS em relação a outros métodos de detecção é a possibilidade de selecção dos métodos de varrimento (*scanning*) da amostra após esta passar pelo detector. Isto é visível na Figura 1.16, que apresenta um exemplo de crude provindo no Canadá; foram recolhidas amostras em vários substratos do local do derrame, cerca de 22 anos após o derrame e comparadas com as amostras recolhidas em 1970, aquando do derrame.⁶² A influência da biodegradação pelo solo e ambiente marítimo alterou completamente o perfil cromatográfico da amostra, com a ausência de alcanos, terpenos ou isoprenóides no perfil por CG-FID, com uma UCM considerável que ocupa a maioria do cromatograma.

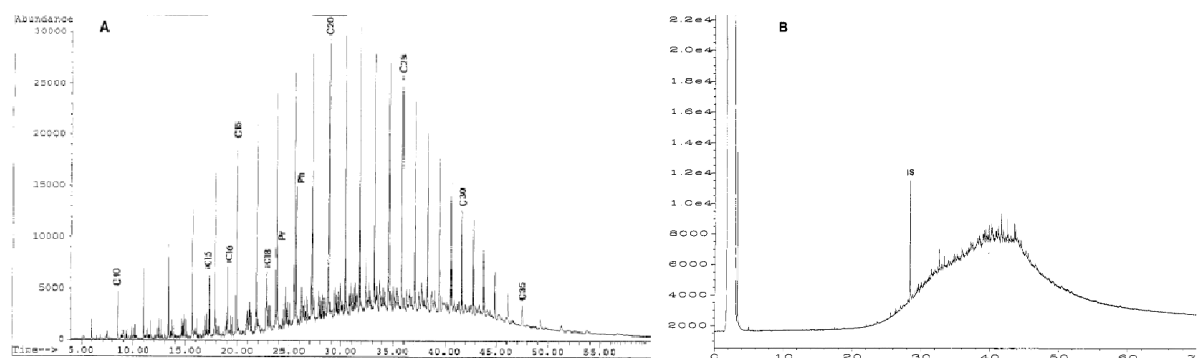


Figura 1.16 - A) GC-MS (SIM: m/z 85.00) de crude do petroleiro Arrow armazenado e B) GC-FID de crude recolhido em 1992 do derrame na Baía Chedabucto (Canadá) pelo petroleiro Arrow em 1970 (Adaptado de Wang et al ⁶²)

A análise GC-MS permite ver picos finos, que poderão ser posteriormente identificados, pelo contrário a GC-FID apresenta a já descrita UCM. No entanto, esta definição obtida no MS só é possível empregando a chamada Monitorização Selectiva de Ião (SIM), caso contrário apresentaria um cromatograma similar ao obtido em GC-FID. Em SIM, um modo de *screening* (ou triagem), o detector recebe o único ião seleccionado, aumentando assim a sensibilidade ao escolher o m/z adequado aos analitos de interesse (e.g. m/z 83 ou 85 são muito utilizados para a observação de hidrocarbonetos lineares e ramificados). É possível também fazer um processo similar recorrendo apenas ao *software* de análise; utilizando um detector em modo de varrimento total (ou seja, todos os iões são detectados), utiliza-se o *software* para criar um Cromatograma com Extracção de Ião (XIC), simulando a SIM retendo, no entanto, a capacidade de observar o cromatograma completo ou seleccionar diferentes m/z

sem ser necessário repetir a cromatografia. Os dois modos SIM e XIC são similares, sendo distinguidos pelo facto do primeiro ser efectuado no próprio detector e o segundo só na análise dos dados.⁵⁴ A utilização de SIM é particularmente importante pois permite maior sensibilidade do que o XIC, pois este último está dependente da percentagem relativa do ião de interesse detectada pelo *full scan*; no caso de analitos que constem nas bibliotecas espectrais, a abundância relativa de determinados fragmentos pode permitir mais facilmente a identificação destes do que em modo de varrimento total, ao ignorar os fragmentos não desejados.

A utilização de GC-MS em petroquímica garante imensa informação importante, não só após desastres ambientais, mas também no âmbito industrial e comercial, nomeadamente no que diz respeito à caracterização física e química de petróleos e derivados. Um dos exemplos é o controlo de qualidade do produto da indústria de refinação de hidrocarbonetos que pode ser feito por GC-MS, permitindo resultados muito satisfatórios, mantendo a integridade das amostras e conseguindo avaliar um grande conjunto de amostras (crude, gasóleo, óleos lubrificantes, entre outros) e respectivos compostos maioritários, sem necessidade de uma destilação tradicional prévia à análise.⁶³ A avaliação das amostras de gasóleo antes e após os processos de refinação permite garantir a ausência de contaminações, para além de ser possível contribuir bibliotecas de identificação em caso de derrame ou escorrência.

Apesar da utilização versátil, nem sempre é possível resolver as UCM por GC-MS. Desta forma, a detecção por MS tem vindo a ser associada às técnicas bidimensionais de cromatografia gasosa (GCxGC-MS), que permitem resolver alguns dos problemas envolvendo os hidrocarbonetos presentes no *hump* ainda visível após GC-MS, numa gama bastante alargada de massa (no caso da figura 1.16, entre C₁₈ e C₄₀). A utilização de duas dimensões de análise em GCxGC-MS permite, por exemplo, a separação de compostos em função do ponto de ebulição numa das dimensões e em função da polaridade na outra dimensão, recorrendo a diferentes fases estacionárias para tal, utilizando o MS como método de detecção.³⁴ No entanto, como técnica com custos elevados e interpretação difícil, não é aplicada correntemente, mas estudada devido aos resultados promissores que parece apresentar na identificação de biomarcadores minoritários do petróleo.⁶⁴

1.4.2.1 – Líquidos Iónicos como fase estacionária em Cromatografia Gasosa

Os Líquidos Iónicos Estáveis à Temperatura Ambiente (RTIL) são uma classe de compostos recentes, utilizados como solventes em reacções de síntese com moléculas polares complexas, com pontos de fusão relativamente baixos (<100°C).⁶⁵ São sais (ou seja, compostos por pares de aniões e catiões – geralmente um catião orgânico e um anião inorgânico), ao contrário da maioria dos líquidos que são geralmente moléculas neutras. Um dos primeiros líquidos iónicos à temperatura ambiente a ser sintetizado foi o nitrato de etilamónio, em 1914⁶⁶, com um ponto de fusão de 12°C, e composto por um par catião-anião ([C₂H₅NH₃]⁺[NO₃]⁻); apesar da sua elevada reactividade e nenhum uso prático, a sua descoberta por Paul Walden inaugurou a investigação desta nossa classe de compostos. Mais tarde, nos anos 80, a introdução dos sais de alquilimidazol⁶⁷ permitiu a utilização mais difundida dos líquidos iónicos, bem como um maior consenso na definição do conceito “Líquido Iónico”, nomeadamente as incursões na chamada química verde, na aplicação a processos separativos, indústria farmacêutica e baterias eléctricas.⁶⁸ Recentemente líquidos iónicos foram também identificados como bons solventes em oxidações catalisadas por enzimas dependentes de cofactores.⁶⁹

As suas características físicas, como a viscosidade (adequada para o revestimento de uma coluna capilar), baixo ponto de fusão, baixa pressão de vapor e estabilidade a temperaturas elevadas torna-os adequados para fases estacionárias de cromatografia gasosa.⁶⁵ Ao contrário das fases estacionárias mais comuns, como o polisiloxano e o polietilenoglicol, os líquidos iónicos não possuem um único mecanismo dominante de interacção com os compostos a serem cromatografados⁷⁰; interagem de forma diferente com os compostos polares e não polares, demonstrando capacidades bipolares de separação. A combinação entre os catiões e os aniões utilizados altera a selectividade e solubilidade da fase estacionária, nomeadamente a extensão do *tailing* e inversão da ordem de eluição de alguns compostos⁷¹, como será possível constatar na parte experimental.

A tolerância dos líquidos iónicos à presença de água foi uma das grandes evoluções dos RTIL modernos, em relação aos baseados em cloroaluminatos de piridínio e imidazólio, permitindo obter colunas de líquidos iónicos que podem operar na presença de humidade ou com amostras aquosas. Esta característica permite a aplicação dos RTIL à cromatografia de amostras de solo ou águas subterrâneas para análise de hidrocarbonetos.⁷¹

A fase estacionária mais utilizada em colunas de GC é composta por polímeros de Polisiloxano (Figura 1.17); possuem grupos terminais hidroxilo que contribuem para a degradação da fase (interacção com amostras que possuam água e oxigénio) e contribuem para o *bleeding* da coluna a temperaturas mais elevadas. Recorrendo ao polisiloxano, poucas modificações químicas à coluna são possíveis; regra geral, são inseridos grupos metil, fenil, fluoropropil ou cianopropil, e criadas combinações e percentagens distintas na composição total da fase estacionária.⁷²

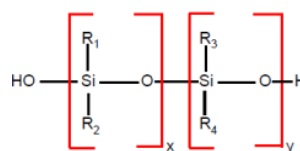


Figura 1.17 - Polisiloxano

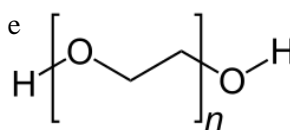


Figura 1.18 – Polietilenoglicol (PEG)

Outra fase estacionária comum é a derivada de Polietilenoglicol (PEG – Figura 1.18), com uma polaridade elevada e limites de temperatura máximos entre os 240°C e os 280°C (dependendo dos fabricantes). Devido aos grupos terminais hidroxilo, as colunas de PEG à semelhança das de polisiloxano, possuem uma degradação e um *bleeding* elevados, especialmente se sujeitas a temperaturas limite⁷³, reduzindo o seu tempo de vida.

Em relação a estas características das fases estacionárias mais tradicionais, é possível verificar que as principais vantagens das colunas de líquidos iónicos são a possibilidade de modificação da fase estacionária e as suas propriedades consoante as necessidades (fases di ou policationicas, alteração do catião, anião e *linkage*, adição de outros grupos), o baixo *bleeding* e altos limites térmicos, uma boa ortogonalidade (aplicação a separações multidimensionais) e tolerância à presença de água.⁷³

A Supelco (Sigma-Aldrich), em 2008, criou as colunas cromatográficas SLB™-IL, com várias fases estacionárias de líquidos iónicos, comercializadas com nomes (e.g. SLB-IL59) que fazem referência à sua constante de McReynolds.⁷⁴ As constantes de Rohrschneider-McReynolds descrevem as interacções de uma fase estacionária com os analitos em comparação com uma não-polar de referência (esqualano), em função de índices específicos de solutos de referência (Figura 1.19). Os valores são expressos como unidades relativas de polaridade; na verdade, não expressam directamente a polaridade da coluna, mas somente uma média indicativa das interacções moleculares entre os compostos e a coluna: interacções π - π , dipolo-dipolo, dipolo induzido-dipolo, pontes de hidrogénio, carácter dipolar, aceitação e doação de protões e carácter ácido.⁷⁴

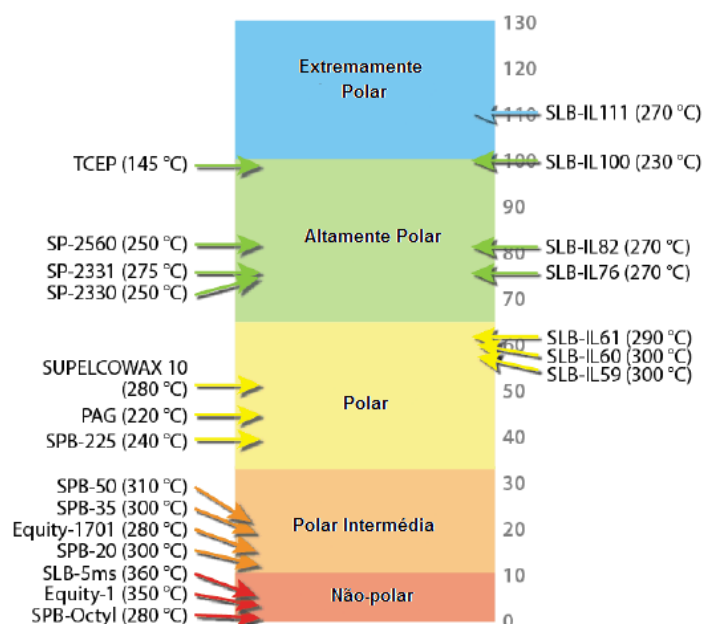


Figura 1.19 - Escala comparativa de fases estacionárias de GC indicando as constantes de McReynolds e temperaturas máximas de cada coluna. Do lado esquerdo, as colunas tradicionais e do lado direito, as colunas IL da Supelco⁷⁵

Como é possível observar, para uma polaridade idêntica, as colunas de líquidos iónicos possuem maior estabilidade térmica. Contudo, ainda não existe coluna IL de polaridade inferior à da SupelcoWax; no domínio das colunas bastante polares, são superiores em termos de variedade e temperaturas máximas de trabalho. A diminuição do *bleeding* é particularmente evidente (Figura 1.20), e muito útil quando operando a temperaturas elevadas, como é o caso da separação de fracções mais pesadas das misturas de hidrocarbonetos.

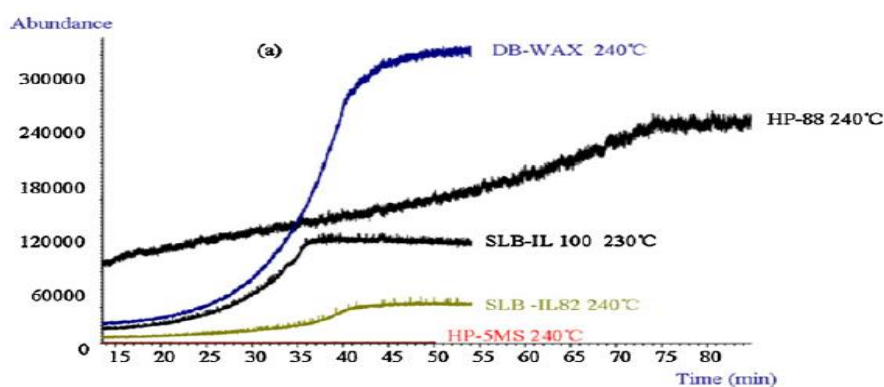
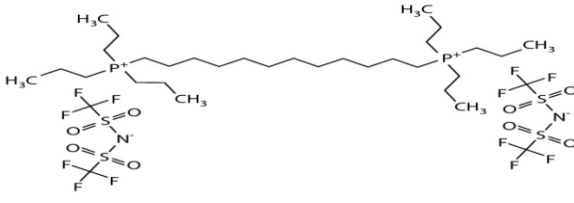
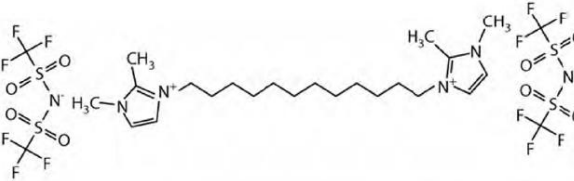
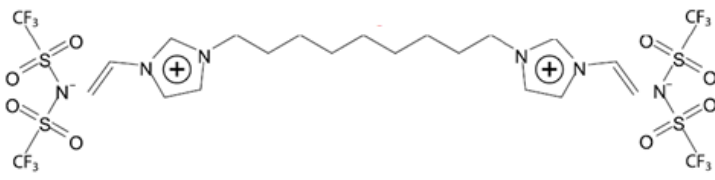
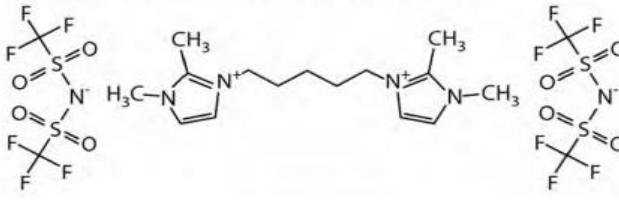


Figura 1.20 - Comparação do *bleeding* de cinco colunas: DB-Wax, HP-88 e HP-5ms (colunas tradicionais) e SLB-IL100 e SLB-IL82 (colunas de líquidos iónicos) (Adaptado de Gu et al⁷⁶)

Pela forma como são sintetizados os líquidos iónicos, é possível a introdução de diferentes iões, com características diferentes, de forma a alterar a sua polaridade e selectividade, como já foi anteriormente referido. Na Tabela 1.1, abaixo, resumem-se as principais fases estacionárias comercializadas pela Supelco e as suas características; não estão representadas todas as existentes, algumas já foram descontinuadas ou substituídas.

Tabela 1.1 - Algumas colunas de líquidos iônicos Supelco⁷³

	Líquido Iônico	Observações
IL60	<p>1,12-Di(tripropilfosfônio)dodecano bis(trifluorometilsulfonil)imida</p> 	<p>Baixo <i>bleeding</i>, coluna de polaridade intermédia (similar às colunas PEG mas com maior temperatura máxima) Composição igual à IL59 mas mais inerte</p>
IL82	<p>1,12-Di(2,3-dimetilimidazólio)dodecano bis(trifluorometilsulfonil)imida</p> 	<p>Potencial de separação de isômeros <i>cis</i> e <i>trans</i> Moderadamente polar</p>
IL100	<p>1,9-Di(3-vinylimidazólio)nonano bis(trifluorometilsulfonil)imida</p> 	<p>Polaridade similar ao TCEP Altamente polar</p>
IL111	<p>1,5-Di(2,3-dimetilimidazólio)pentano bis(trifluorometilsulfonil)imida</p> 	<p>Polaridade muito elevada (a mais alta do mercado) Padrões de eluição únicos Ideal para GCxGC pela sua ortogonalidade</p>

Foi já demonstrado que a coluna IL59 (e, conseqüentemente, a IL60, com selectividade muito similar) possui polaridade similar às colunas de PEG, possuindo, para vários compostos, maior resolução do que as colunas polares tradicionais.⁷⁷ Em muitos casos, foi verificada alteração da ordem de eluição, o que não é necessariamente uma desvantagem se forem utilizados padrões adequados.⁷⁷ Para além disso, as colunas de líquidos iônicos têm apresentado menor *tailing* e menos coeluições do que as colunas PEG, para um conjunto variado de analitos, desde aldeídos a hidrocarbonetos cíclicos.

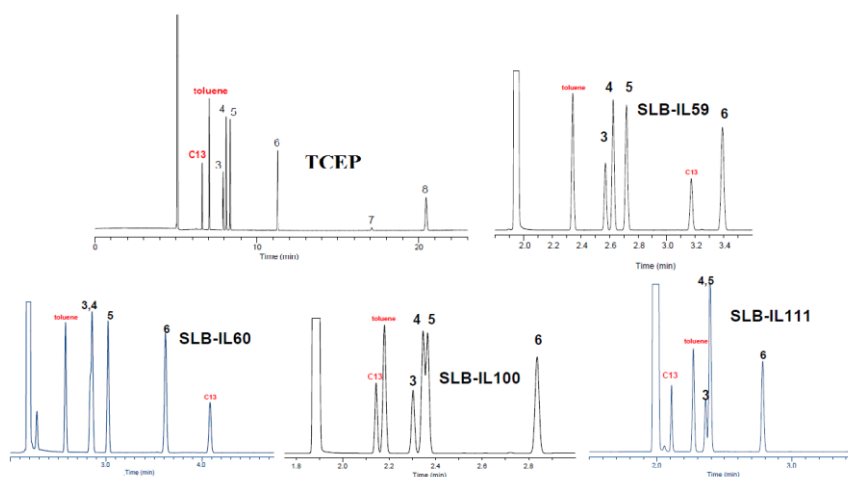


Figura 1.21 - Comparação de tempos de retenção e ordem de eluição em colunas de líquidos iónicos e coluna TCEP, num programa isotérmico a 110°C. Compostos - **1**: n-tridecano, **2**: tolueno, **3**: etilbenzeno, **4**: p-xileno, **5**: isopropilbenzeno (cumeno), **6**: 1,2,4-trimetilbenzeno, **7**: 1,2,4,5-tetrametilbenzeno (dureno), **8**: ciclohexanona (Adaptado de Sigma Aldrich⁷⁸)

Como é possível verificar na Figura 1.21, a separação dos compostos em qualquer uma das colunas de líquidos iónicos foi executada em menos tempo do que na coluna TCEP (1,2,3-Tris(2-CianoEtóxi)Propano), mesmo naquelas com polaridade elevada e similar à TCEP; o 1,2,3-trimetilbenzeno apresenta tempos de retenção pouco superiores a três minutos na maioria dos líquidos iónicos, enquanto que na TCEP excede os onze minutos. É possível observar que existiu coeluição de alguns analitos em duas das colunas RTIL, mas o facto de se conseguir separações com menos sete minutos de tempo de retenção permite maior flexibilidade na adaptação das condições do método cromatográfico.

Alergenos, pesticidas e diferentes óleos essenciais foram separados em seis fases estacionárias RTIL (IL59, IL60, IL61, IL82, IL100 e IL111)⁷⁹, verificando-se que possuíam características comparáveis ou superiores às colunas convencionais na maioria dos testes, apesar da coluna IL76 ter sido omitida dos resultados do estudo por não realizar as separações adequadamente.

Amostras complexas possuem analitos com diferentes características químicas, levando a que as técnicas convencionais de separação nem sempre possuam a resolução necessária para uma análise eficaz das mesmas; apesar dos avanços das técnicas hífenadas, a introdução das colunas de líquidos iónicos foi um passo decisivo no aumento da capacidade de separação de amostras complexas.⁸⁰ A elevada ortogonalidade apresentada pelas colunas de líquidos iónicos, torna-as também ideais para a aplicação em técnicas bidimensionais, o que possibilita estudos futuros de GCxGC em biomarcadores utilizando estas colunas. Além da composição conter hidrocarbonetos, como já foi referido, o crude possui também outros compostos em quantidades minoritárias, particularmente nas fracções mais pesadas, como os compostos contendo enxofre, que podem chegar a 6% do peso total do crude.⁸¹

Biomarcadores importantes contendo enxofre são os derivados de benzotiazole⁸², cuja abundância é dependente do pH do meio em que foi formado, permitindo identificar a origem sedimentar do crude de forma mais definitiva do que utilizando outros biomarcadores (já referidos). O uso de colunas tradicionais na separação dos benzotiazoles e outros compostos sulfurosos das fracções de crude requer passos varios de preparação de amostra (Sohxlet, separação em coluna, extracção líquido-líquido, entre outros).⁸² No entanto, a utilização colunas de líquidos iónicos para análise de Heterociclos Policíclicos Aromáticos de Enxofre (PASH) em GCxGC permite a facilitação da

preparação e análise destes compostos específicos, particularmente nas matrizes mais complexas do crude. A utilização de diferentes detectores, como o FT-ICR-MS (Espectrometria de Massa de Ressonância Ciclotrónica de Iões com Transformada de Fourier) ou o SCD (Detector de Quimioluminescência de Enxofre), associados à cromatografia compreensiva bidimensional com colunas de líquidos iónicos parece descartar a necessidade de preparações complexas de amostra pouco ecológicas. A utilização dos líquidos iónicos permite igualmente, como já referido, efectuar cromatografia a temperaturas mais elevadas do que com colunas tradicionais, no domínio das fases estacionárias polares.⁸⁰

Embora a utilização dos líquidos iónicos como fase estacionária seja recente e *quasi* embrionária, é uma área promissora, já com algumas provas de sucesso em relação às fases estacionárias tradicionais. Apesar dos múltiplos avanços na área da detecção e novas tecnologias cromatográficas, a evolução das fases estacionárias estagnou durante décadas até à introdução dos líquidos iónicos em colunas cromatográficas, sendo, portanto, uma área de interesse para avaliação em diferentes matrizes de análise.⁷³

1.4.2.2 – Compostos quirais como fase estacionária em Cromatografia Gasosa

A quiralidade é uma característica de assimetria em que uma molécula é distinguível e não-sobreponível à sua imagem no espelho.⁸³ É um aspecto importante na química dos seres vivos, pois muitas das principais moléculas biológicas essenciais ou bioactivas (como os aminoácidos ou hidratos de carbono) possuem uma orientação espacial definida - geralmente apenas um dos estereoisómeros da molécula (e.g. α -aminoácidos com configuração L). O estudo das moléculas quirais é o foco da estereoquímica, ramo que se dedica ao arranjo espacial das moléculas, importante para a química farmacêutica, biológica e astroquímica.⁸⁴

No que diz respeito à utilização de moléculas quirais na separação de compostos em cromatografia gasosa, existem várias que têm sido utilizadas como fases estacionárias, sendo as ciclodextrinas, e seus derivados, as mais comuns.⁸⁴

As ciclodextrinas (CD) são hidratos de carbono (oligossacarídeos), compostos quirais constituídos por várias unidades de α -D-glicopirranose (mais comumente chamada glicose), unidas por ligações glicosídicas e que adoptam a configuração tridimensional em cadeira numa disposição toroidal (Figura 1.22). Existem três grupos de CD, as α -, β - e γ -ciclodextrinas com 5, 6 e 7 anéis respectivamente.⁸⁵

Os grupos hidroxilo livres na parte externa da molécula conferem carácter hidrofílico às CD, o que possibilita a formação de complexos, enquanto que a parte interna é muito menos hidrofílica (mas não necessariamente hidrofóbica)⁸⁵ possibilitando a distinção de interacção entre enantiómeros através de interacções de inclusão – ou seja, um “hospedeiro” (a ciclodextrina) que possui uma cavidade onde se liga o “hóspede” (o analito), seleccionando determinadas características físicas do hóspede. Por exemplo, devido ao arranjo no espaço livre do toróide de CD, existirão impedimentos estereoquímicos na ligação com moléculas com orientação espacial, mas não com o seu enantiómero ou diastereoisómero; este facto tem particular interesse na alteração da solubilidade ou distribuição biológica de fármacos⁸⁶, ou na separação enantiomérica de compostos.

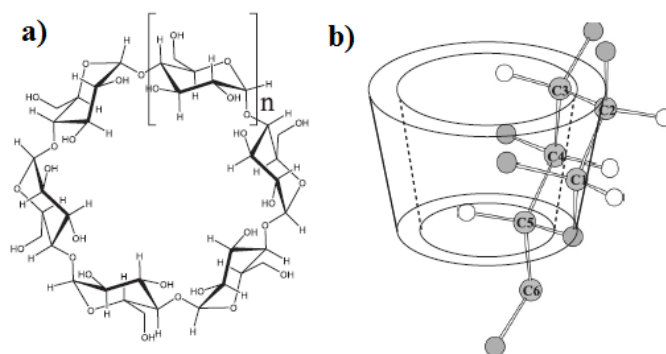


Figura 1.22 - a) Estrutura geral das Ciclodextrinas b) Representação esquemática da estrutura tridimensional como toróide (Adaptado de Britto et al⁸⁵)

Uma das fases estacionárias quirais mais versátil é a CP-Chirasil-Dex CB (Agilent J&W)⁸⁷, em que moléculas de β -ciclodextrina estão ligadas quimicamente a um filme de PDMS, garantindo uma superfície homogênea de enantioselectividade na coluna, maior sensibilidade em relação a colunas exclusivamente de CD e menor *bleeding*.⁸⁸ Uma das principais vantagens da aplicação de uma coluna quiral é efectuar a separação de enantiómeros devido às diferenças na orientação espacial; as colunas aquirais não separam enantiómeros pois estes possuem as mesmas propriedades físicas, sendo usualmente necessário proceder à derivatização para obter os seus diastereoisómeros (que já possuem propriedades físicas distintas), passo adicional que pode interferir com outros analitos de interesse, como no caso dos derivados de petróleo.

Na Figura 1.23 destaca-se a utilização de colunas quirais para a separação de isómeros; não sendo os diferentes xilenos compostos quirais, mas sim isómeros constitucionais, os impedimentos decorrentes do arranjo espacial causados pela forma toroidal das CD permitem (por vezes) a sua separação adequada (é comum coeluirem nas fases estacionárias aquirais devido a possuírem pontos de ebulição muito próximos). Isto significa que mesmo compostos sem estereoisómeros, sendo apenas isómeros estruturais, podem só ser separados pelas CD devido à proximidade dos valores das características físicas. Isto parece ser particularmente relevante nos derivados do crude de baixa massa molecular, como a gasolina ou a nafta, que são caracterizadas cromatograficamente através dos rácios de compostos usados como biomarcadores, tais como benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX)⁸⁹, pelo que qualquer alteração por reacções adicionais (como a derivatização) poderá influenciar a sua utilização na datação ou identificação de origem.

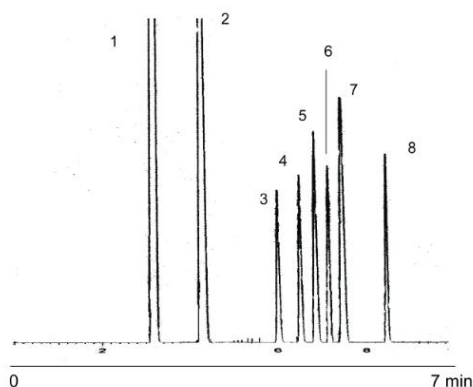



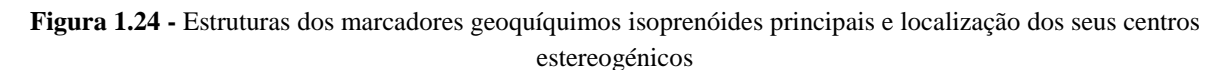
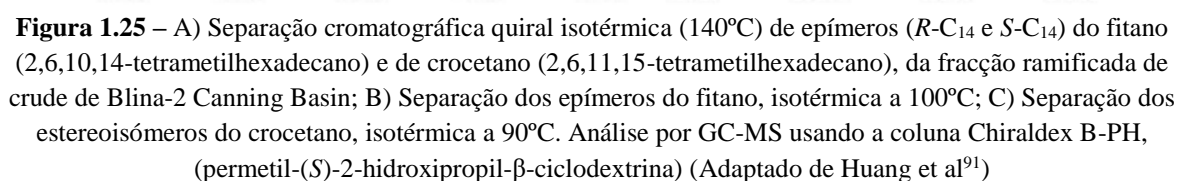


Figura 1.23 - Separação de compostos BTEX e isómeros do xileno por GC-FID utilizando uma coluna quiral (CP-Chirasil-Dex): 1: benzeno, 2: tolueno, 3: *p*-xileno, 4: *m*-xileno, 5: etilbenzeno, 6: *o*-xileno, 7: estireno, 8: cumeno. Condições: 80°C (6min) -> 130°C, 25°C/min, Split, Temp. Injector=210°C, Temp. Detector=230°C (Adaptado de Agilent Technologies, Inc⁹⁰)


 Pristano
 
 Fitano
 
 Crocetano



O crocetano é ainda considerado como sendo um biomarcador usado para identificar zonas de transição sulfato-metano (zona à margem dos continentes onde existem associações de bactérias redutoras de sulfatos e *archaea* oxidantes de metano⁹²), tendo a sua presença a capacidade de permitir localizar (mais eficazmente) a origem de um determinado crude ou determinar a existência de um processo de degradação. No entanto, como já referido, a similaridade entre o crocetano e o fitano tornam difícil a sua separação cromatográfica; alguns processos complexos foram experimentados com sucesso na separação de isoprenóides, como a utilização sequencial de HPLC, GC e electroforese capilar recorrendo a selectores quirais baseados em ciclodextrina⁹¹, indicando que fases estacionárias envolvendo ciclodextrinas possuíam uma boa capacidade de separação para estes compostos.



A enantioseparação de pequenos alcanos quirais sem outros grupos funcionais é uma das grandes dificuldades em cromatografia, devido à interação com a fase estacionária ser unicamente devida às (fracas) forças de Van der Waals. A utilização de ciclodextrinas como fases estacionárias de colunas capilares (como a Chirasil-Dex ou a família ChiralDEX) na separação de alcanos ramificados em amostras petroquímicas adiciona o efeito da inclusão molecular, permitindo assim a separação de isômeros que não eram resolvidos pelas fases aquirais. A aplicação à separação de alcanos ramificados ou cíclicos não-funcionalizados tem vindo a requerer a alteração das fases estacionárias, tal como a introdução ou modificação de substituintes alquila das ciclodextrinas, alterando a enantioselectividade por mecanismos ainda desconhecidos.⁹³

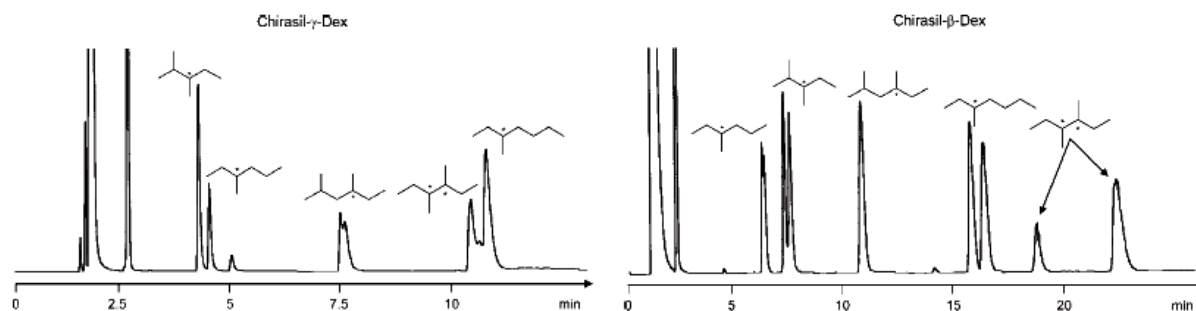


Figura 1.26 - GC-FID de misturas racêmicas de 3-metilhexano, 2,3-dimetilpentano, 2,4-dimetilhexano, 3-metilheptano e 3,4-dimetilhexano com a coluna Chirasil- γ -Dex (esquerda) e Chirasil- β -Dex (direita), em isotérmica a 30°C (Adaptado de Sicoli et al⁹³)

A figura 1.26 ilustra as diferenças na selectividade e enantioseparação cromatográficas de alcanos ramificados, usando 2 CD diferentes como fases estacionárias.

A análise de biomarcadores ramificados e/ou quirais possui grande importância nas amostras degradadas de derivados de crude. Como já referido, a biodegradação altera o seu perfil cromatográfico e as suas quantidades relativas; dependendo do tamanho da cadeia carbonada e orientação espacial, os hidrocarbonetos podem ser mais ou menos susceptíveis à degradação microbiana anaeróbia.⁹⁴ Os rácios ou quantidades relativas dos diferentes isômeros podem permitir obter informação importante acerca da origem do crude e/ou do tempo de permanência no solo. A análise de misturas isoméricas, embora contenha informação importante, possui constrangimentos: no que diz respeito aos biomarcadores com quiralidade, podendo os enantiómeros estar presentes em diferentes proporções, dependendo da origem, tempo de degradação e ambientes petroquímico e microbiológico do local.⁹⁵ Um dos exemplos envolve os alquilnaftalenos, que compõem a maioria da fracção de hidrocarbonetos aromáticos no crude, alguns dos quais com origem ainda por elucidar. As tetralinas (derivados do 1,2,3,4-tetrahidronaftaleno) possuem uma estrutura similar ao drimano (Figura 1.27), um possível marcador de origem microbiana, e que por desidrogenação origina variados alquilnaftalenos.⁹⁶

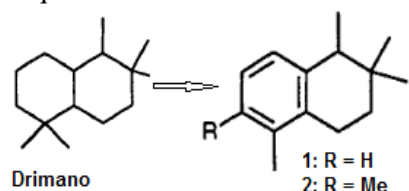


Figura 1.27 – Estruturas do drimano e
1) 1,2,2,5-Tetrametiltetralina e 2)
1,2,2,5,6-Pentametiltetralina

A presença destes “intermediários” em amostras de crude varia em função da maturidade das amostras, ou seja, dos processos de biodegradação que sofreram. As tetralinas mostraram-se menos abundantes com o aumento da maturidade de amostras de crude analisadas, sendo inversamente proporcionais à abundância dos alquilnaftalenos.

Apesar de não serem marcadores usualmente utilizados, a prevalência dos alquilnaftalenos pode conter informação importante na identificação e datação de amostras de crude, motivo pelo qual o estudo destes compostos usando colunas quirais possui potencial para a identificação e para o desenvolvimento de novos métodos para caracterização de combustíveis e seus derivados.⁹⁶

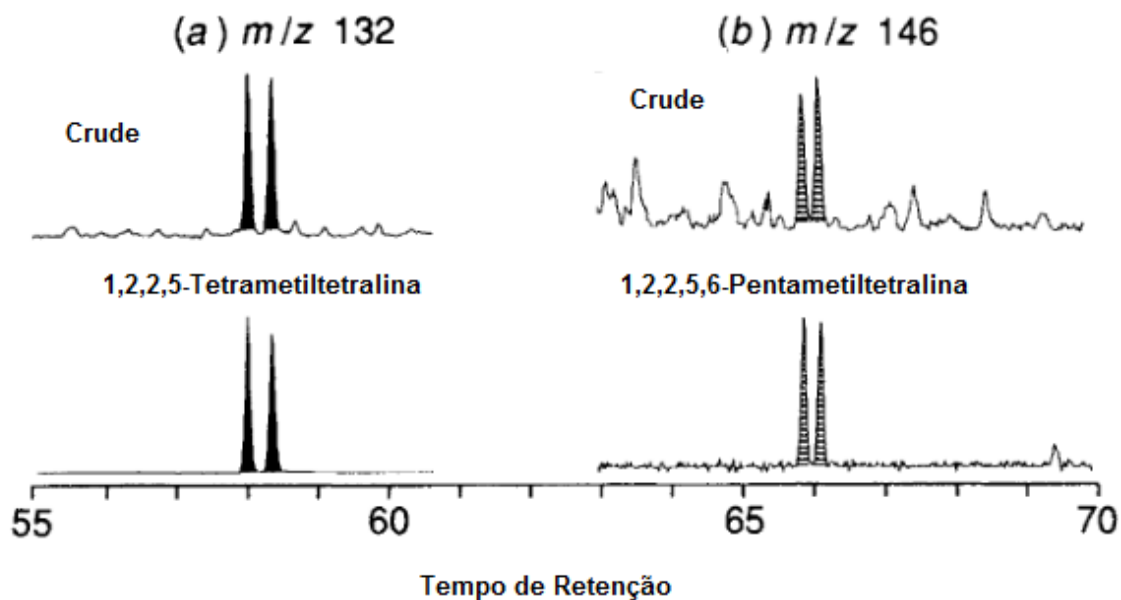


Figura 1.28 - Traçados de monitorização de íão (SIM, m/z 132 e 146) de crude originário de *Eromanga Basin*, Austrália, envolvendo a separação dos enantiómeros das duas tetralinas **(a)** 1,2,2,5- Tetrametiltetralina e **(b)** 1,2,2,5,6- Pentametiltetralina utilizando uma fase estacionária quiral (CYDEX-B - (β -ciclodextrina permetilada, similar à Chiraldex-B)) (Adaptado de Alexander et al⁹⁶)

Capítulo 2 - Procedimento Experimental

2.1. Amostras

Na preparação de amostra (SPME), foram utilizadas as seguintes amostras: Gasolina 95 comercial, Gasóleo Simples comercial, argila e areia.

No desenvolvimento dos métodos cromatográficos utilizaram-se como padrões uma mistura de Undecano, Naftaleno e Eicosano a 10 ppm em Hexano 99% (GC-Grade).

Nos ensaios em GC-FID com fase estacionária de líquidos iónicos (RTIL), utilizaram-se como amostras: Gasolina 95 comercial, Gasóleo Simples comercial, Combustível de Avião (*Jet fuel*), Petróleo comercial, Petróleo de Iluminação Comercial e Diluente comercial (em lata).

Nos ensaios em GC-MS, utilizaram-se como amostras: Gasolina 95 comercial, Gasóleo Simples comercial, Combustível de Avião, Petróleo comercial, Petróleo de Iluminação Comercial e Diluente comercial (em lata).

Como padrões cromatográficos foram utilizados os seguintes compostos (1µL/mL Hexano): 1,2,3,5-Tetrametilbenzeno, 1,2,4,5-Tetrametilbenzeno, 1,2,3-Trimetilbenzeno, 1,2,4-Trimetilbenzeno, 2,6,10,14-Tetrametilpentadecano (Pristano), 2,6,10,14-Tetrametilhexadecano (Fitano), Etilbenzeno, 2-Etiltolueno, 3-Etiltolueno, 4-Etiltolueno, Undecano, Eicosano, *m*-Xileno, *o*-Xileno, Naftaleno, Propilbenzeno e Tolueno.

Nos ensaios em GC-FID, para quantificação, foram utilizados como padrões: Undecano e 2,6,10,15-Tetrametilpentadecano (Pristano), nas concentrações de 5, 10, 25, 50 e 100ppm em Hexano, Pristano na concentração de 5 ppm em água Milli-Q, e a mistura padronizada 40147-U, que contém os hidrocarbonetos lineares de C₈ a C₄₀, Pristano e Fitano (500ppm em Dissulfeto de carbono e Diclorometano), diluídas em concentrações de 5, 10, 25, 50 e 100ppm – com uma adição (*spike*) de Pristano na mesma concentração da solução.

2.2. Preparação de Amostra (SPME)

Para o desenvolvimento do método de preparação de amostra, utilizaram-se os suportes manuais de micro-extracção em fase sólida, SPME, Sigma-Aldrich 57330-U, e quatro fibras distintas: PDMS, CAR/PDMS, PDMS/DVB e DVB/CAR/PDMS (Supelco), tendo por objectivo a extracção dos hidrocarbonetos presentes nas diferentes amostras. As fibras foram inicialmente condicionadas, no injector do GC, de acordo com o manual de recomendações do fabricante, para remover potenciais contaminantes e estabilizar a fase polimérica usada (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 - Resumo das condições de utilização das fibras de SPME (recomendações da Sigma-Aldrich)

	Temperaturas de Trabalho (°C)	Temperatura de Condicionamento (°C)	Tempo de Condicionamento (hora)
PDMS	200-280	250	0.5
PDMS/DVB	200-270	250	0.5
CAR/PDMS	250-310	300	1
DVB/CAR/PDMS	230-280	270	1

Para os ensaios por HS-SPME, foram preparadas amostras usando cerca de 0,5Kg de mistura de areia e argila seca, colocadas em frascos de vidro hermeticamente selados; a um deles adicionou-se 50mL de Gasóleo comercial, a outro 50mL de Gasolina comercial, os quais foram dispersos homogeneamente. Posteriormente, os frascos ficaram abertos à temperatura ambiente durante 8 semanas, até se verificar que a mistura de solo se encontrava seca e sem combustível líquido visível e/ou palpável ao tacto. Decorrido o tempo, os frascos foram selados.

Para a análise em *headspace*, HS-SPME, colocou-se cerca de 1g da mistura de solo contendo hidrocarbonetos num vial de vidro de 50mL, selado com selo de alumínio com septo central de borracha. O vial foi então termoestabilizado (imerso até meio num copo de precipitação com água destilada, numa placa de aquecimento (regulada para a temperatura específica de cada ensaio); a agulha do *holder* foi então introduzida através do septo, e a fibra exposta à zona superior do vial (*headspace*).

Decorrido o tempo de exposição/extracção, a fibra foi recolhida para dentro do *holder*, removida do vial e seguidamente introduzida no injector do cromatógrafo gasoso (GC-MS, GC-FID) e novamente exposta, durante 15 minutos a 260°C, para desadsorção ou desabsorção térmica dos compostos. Após cada injeção, as fibras foram recolocadas no injector a 260°C durante 30 minutos, sendo feito um ensaio (branco da fibra) durante esse tempo, para verificar a ausência de contaminantes ou degradação da fase da fibra.

As variáveis estudadas no procedimento experimental foram: fibra de SPME, a temperatura de exposição e o tempo de exposição. Para a temperatura de exposição, utilizou-se uma placa de aquecimento regulada para 54°C, 76°C e 88°C, e desligou-se a placa para os ensaios à temperatura ambiente (aproximadamente 18°C). Quanto ao tempo de exposição da fibra, fizeram-se ensaios com 5, 15, 30, 60 e 120 minutos para o solo com Gasóleo e 5, 15, 30 e 60 minutos para o solo com Gasolina. As fibras testadas estão referidas na Tabela 2.1.

2.3. Análise Cromatográfica

Para a separação e identificação dos compostos por GC-FID utilizando fases estacionárias de líquidos iónicos, os padrões e amostras de combustíveis foram injectados manualmente (utilizando uma seringa Agilent Gold Standard, capacidade 10µL), com um volume de 0.2µL, nas colunas Supelco SLB™IL60 (30 m x 0.25 mm x 0.2µm), Supelco SLB™IL100 (30 m x 0.25 mm x 0.25µm) e Agilent J&W HP-5ms (30m x 0.25mm x 0.25µm) no GC-FID Thermo-Finishing Focus Series; a coluna Supelco SLB™IL82 (30 m x 0.25 mm x 0.25µm) foi instalada no GC-FID Agilent mod. 4890D. Ambos os cromatógrafos possuem injector *split/splitless*, sendo que o modo *split* foi sempre utilizado, numa razão de 1/20. O gás de arraste utilizado foi o hidrogénio. A identidade dos compostos foi determinada por comparação dos seus tempos de retenção com os padrões comerciais (e após análises efectuadas em GC-MS).

Tabela 2.2 - Métodos Cromatográficos desenvolvidos para análise de hidrocarbonetos em combustíveis, em diferentes fases estacionárias

Coluna	Temperatura Inicial °C	Tempo Inicial min	Rampa °C/min	Temperatura Final °C	Tempo Final min	Detector °C	Inlet °C	Fluxo mL/min
IL82	50	10	5	260	10	270	270	1,2
IL60	35	5	4	260	10	290	290	1

HP5	35	5	4	260	10	290	290	1
IL100	35	5	4	230	10	250	250	1

Os métodos cromatográficos (Tabela 2.2) foram desenvolvidos utilizando uma mistura de Naftaleno, Undecano e Eicosano de 10ppm em Hexano de forma a minimizar a largura dos picos cromatográficos, aumentar a resolução e diminuir os tempos totais de corrida sem comprometer a separação, adequando as exigências de temperaturas máximas e mínimas para corresponder às condições recomendadas pelo fabricante. A alteração do fluxo para a IL82 deveu-se à sua utilização num cromatógrafo gasoso Agilent de dupla coluna.

Para as análises envolvendo Espectrometria de Massa, utilizou-se o GC-MS Agilent 6850 GC Network associado ao 5975C VL MSD, equipado com a coluna capilar de sílica fundida Supelco SLB_{TM}-5ms (60m x 0.25 mm x 0.25µm). A temperatura do forno foi programada de 35°C a 260°C, com rampa de temperatura de 4°C/min, com isotérmica inicial de 5 minutos e final de 10 minutos. A temperatura do injector foi 270°C, a da fonte de ionização a 230°C e a da interface do quadrupolo 150°C. O gás de arraste utilizado foi o Hélio, com um fluxo de 1mL/min, em modo *split* com rácio de 1/20, energia de ionização 70eV, corrente de ionização 34.6 µA, gama de massas 35-550 amu e tempo de varrimento de 0,9s, em modo de *full scan*. A identidade dos compostos foi determinada por comparação dos seus tempos de retenção e espectros de massa, com os de padrões comerciais e por comparação com uma biblioteca de espectros de massa existente no laboratório (NIST Standard Reference Database).

Para o estudo da separação cromatográfica em coluna quiral para separação dos biomarcadores geoquímicos, foi instalada uma coluna Agilent J&W CP Chirasil-Dex (25m x 0.25mm x 0.25µm) no GC-FID Agilent mod. 4890D, usando-se HS-SPME (fibra PDMS) na preparação da amostra, extracção feita a 76°C, durante 20 minutos num vial de 50mL. Para estes estudos, foram utilizadas amostras de Pristano e Fitano a 25ppm em pentano e Petróleo diluído em pentano a 10ppm.

2.4 Validação do Método Analítico

Para validação dos métodos analíticos, foram feitos vários ensaios com metodologias distintas, em virtude das diferentes matrizes em que os biomarcadores podem surgir (amostras de crude, solo contaminado, rastreio (*screening*) de águas, entre outros). O objectivo principal foi a validação de um método que fosse mais ecológico e cumprisse os critérios da chamada Química Verde; nomeadamente, através da diminuição de utilização de solventes perigosos e tóxicos, e pela sua substituição por solventes inócuos, água ou a redução de volumes de solventes no geral.

Todas as análises técnicas foram realizadas na coluna SLB_{TM}IL60 (30 m x 0.25 mm x 0.2µm) no GC-FID Thermo-Finningan Focus Series, sendo o método cromatográfico IL60 o referido na Tabela 2.2., com a única diferença de a injeção ser feita em modo *splitless* e a preparação da amostra foi feita usando a fibra PDMS (ao invés de injeção directa com seringa microlitro).

Assim, foi testada a aplicação dos métodos desenvolvidos na preparação de amostra (vial de 50ml, 10 µL de amostra, aquecimento a 76°C, exposição da fibra de SPME durante 20 minutos), com as amostras de Pristano e Undecano, com concentrações de 5, 10, 25, 50 e 100ppm em Hexano (pureza 99%, GC-Grade).

A segunda aplicação envolveu a utilização de uma solução de 10ppm de Pristano em Água Milli-Q, também em vial de 50mL com exposição da fibra durante 20 minutos, com aquecimento a 98°C, fazendo-se testes subsquenciais com diferentes quantidades de amostra: 2, 4, 6, 8 e 10 µL.

Por fim, utilizou-se a mistura de padrões estandardizada 40147-U, descrita na metodologia ASTM D2887 (*Standard Test Method for Boiling Range Distribution of Petroleum Fractions by Gas Chromatography*), que é o principal método acreditado para quantificação dos vários diferentes componentes das frações de petróleo usando cromatografia gasosa. A desvantagem deste método reside na utilização de solventes, diclorometano e dissulfeto de carbono, que apesar de serem os solventes de eleição nas análises de substâncias não polares ou moderadamente polares, ambos são tóxicos para humanos e para o meio ambiente.^{97,98} Foram então colocados 1µL de amostra num vial de 50mL, com aquecimento a 76°C, às concentrações de 1, 5, 10, 25 e 50ppm, com tempo de exposição de 20 minutos.

Capítulo 3 – Resultados e Discussão

3.1 Método de Preparação de Amostra (SPME)

Um dos principais focos deste estudo envolveu a aplicação da SPME por *headspace* como método de preparação de amostras contendo hidrocarbonetos. Para a extração ser eficaz e reprodutível, foi necessário desenvolver uma metodologia própria para as duas principais matrizes: as enriquecidas em hidrocarbonetos cíclicos e ramificados de cadeia carbonada curta (representada pela Gasolina) e as que contêm hidrocarbonetos lineares de maior massa molecular e cadeia carbonada mais longa (representada pelo Gasóleo). Convém ressaltar que todas as matrizes diferem entre si; isto é, um Gasóleo comprado a empresas diferentes pode não ter igual perfil cromatográfico. Ainda assim, a extração por SPME, apesar das diferenças de composição devidas à origem diferente, é aplicável e reprodutível para as diferentes marcas e origens de combustível, como também já foi descrito na literatura.⁹⁹

3.1.1 Fibra

A primeira variável testada foi o tipo de fibra; como descrito no capítulo 1.4.1, existem várias composições para fibras, as quais exibem diferentes comportamentos. Sendo a PDMS a única fibra tida como não-polar, é presumível que esta seja a mais adequada para extração de hidrocarbonetos. No entanto, como as restantes propostas (três) possuem comportamentos bipolares, ou seja, interação de forma distinta com uma vasta gama de compostos, foram também estudadas.

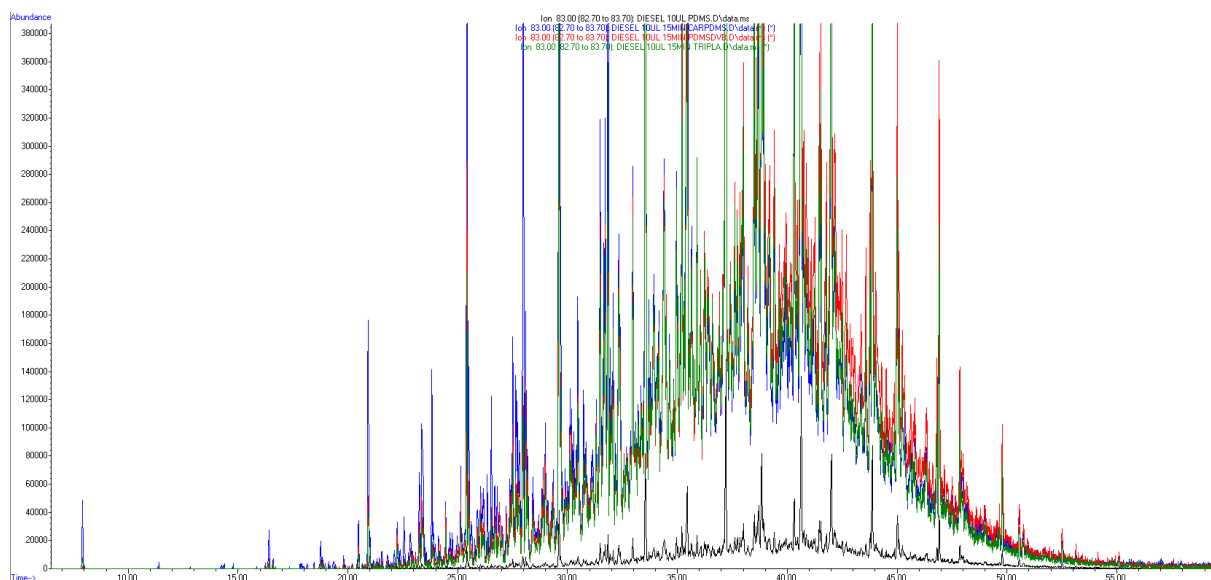


Figura 3.1 – GC-MS (XIC, ião m/z 83) de Gasóleo: estudo comparativo de quatro fibras SPME. PDMS (preto), CAR/PDMS (azul), PDMS/DVB (vermelho) e tripla (verde) na coluna SLB-5ms. Condições: 35°C (5min) -> 260°C (10min), 4°C, Split 1/20, Temp. Injector= 270°C, Temp. Ionização= 230°C, Temp. Quadrupolo= 150°C, full scan: 35-550 amu

A figura 3.1 ilustra o estudo comparativo de quatro fibras de SPME, com extração de 15 minutos a 54°C. A análise recorrendo a XIC (m/z 83), correspondente ao fragmento C_6H_{11} , permitiu observar a composição em hidrocarbonetos, (maioritariamente os lineares) com maior resolução. Nesta análise, as

três fibras bipolares apresentaram uma linha de base com ruído de intensidade muito elevada, o que dificulta a identificação e integração dos compostos separados. A PDMS demonstrou uma melhor separação e resolução dos hidrocarbonetos lineares, com uma razão sinal-ruído maior e a identificação dos principais compostos pela biblioteca NIST foi efectuada de forma correcta, tendo sido, portanto, considerada como a fibra mais adequada para a análise de Gasóleo.

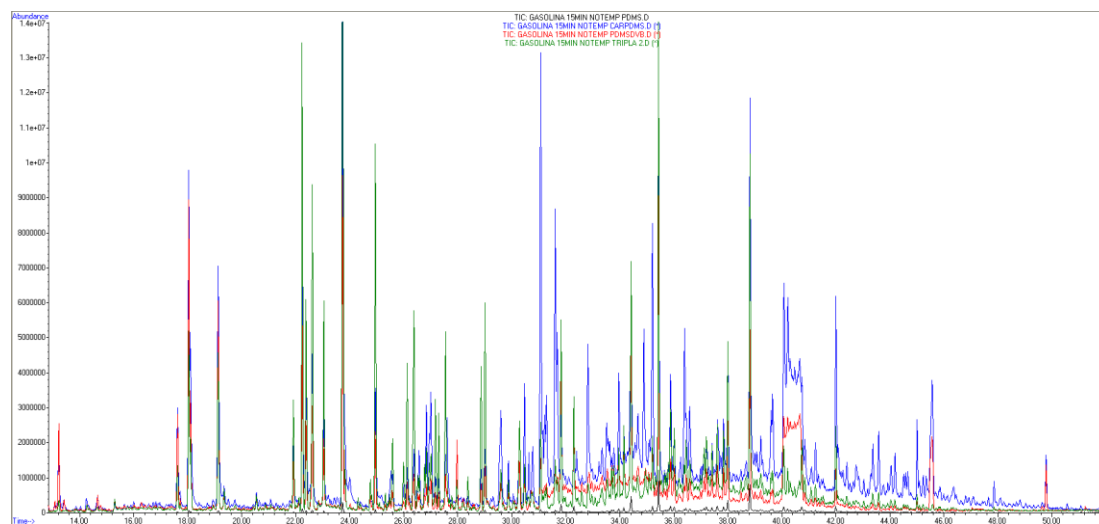


Figura 3.2 - GC-MS de Gasolina simples: comparação da extracção por SPME, usando quatro fibras: PDMS (preto), CAR/PDMS (azul), PDMS/DVB (vermelho) e tripla (verde) na coluna SLB-5ms. Condições: 35°C (5min) -> 260°C (10min), 4°C, Split 1/20, Temp. Injector= 270°C, Temp. Ionização= 230°C, Temp. Quadrupolo= 150°C, full scan: 35-550 amu.

Na análise de gasolina (Figura 3.2), devido à sua composição em hidrocarbonetos ser dominada pelo ponto de ebulição baixo (maior volatilidade), utilizou-se a temperatura ambiente (aproximadamente 18°C). Neste caso, a fibra PDMS não se demonstrou a mais adequada; os compostos são pouco extraídos e a sua identificação pela biblioteca NIST não foi correcta/possível para a maioria dos compostos da família BTEX (principais constituintes das fracções mais leves do petróleo). Entre as fibras tripla (CAR/PDMS/DVB) e PDMS/DVB, não se verificaram diferenças relevantes; a fibra CAR/PDMS demonstrou maior intensidade dos picos mantendo a qualidade de separação, o que evidencia maior afinidade para os compostos desta amostra, tendo por isso sido considerada a mais adequada para as fracções de hidrocarbonetos aromáticos e cíclicos.

3.1.2 Tempo de Exposição

Os valores de tempo escolhidos para a exposição foram retirados de diversas referências na literatura, de publicações com amostras similares, seleccionando cinco valores que abrangessem intervalos de tempo suficientemente grandes para termos de comparação. Apesar de tempos mais extensos do que 120 minutos se encontrassem descritos nalgumas publicações, estes não foram considerados para a parte experimental.

Em termos de intensidade dos picos (portanto quantidades relativas), não houve diferenças relevantes entre os tempos de exposição testados (5, 15, 30, 60 e 120 minutos). O único hidrocarboneto em que se salienta o bom resultado de duas horas de exposição é o C₂₀ (Figura 3.3); ou seja, comparando eficiência VS resolução, não existe razão para um tempo de exposição tão longo quanto duas horas.

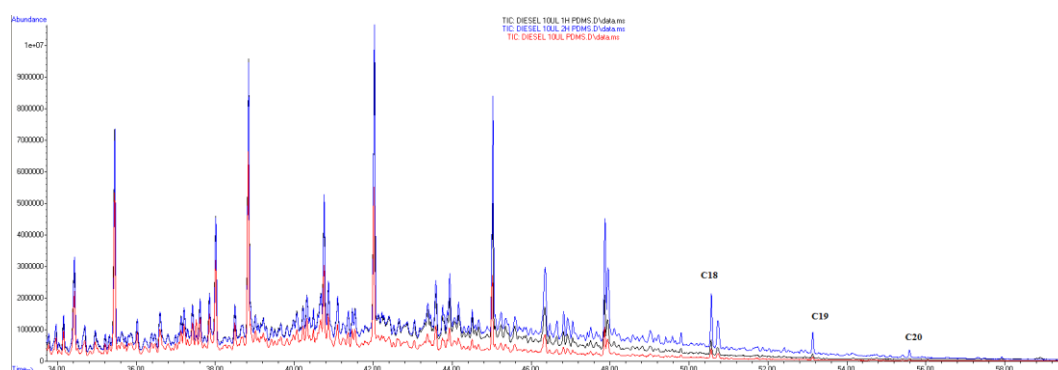


Figura 3.3 – GC-MS de Gasóleo usando SPME (PDMS); cromatograma parcial envolvendo tempos de exposição: 15 minutos (vermelho), 1 hora (preto) e 2 horas (azul) na coluna SLB-5ms. Condições: 35°C (5min) - > 260°C (10min), 4°C, Split 1/20, Temp. Injector= 270°C, Temp. Ionização= 230°C, Temp. Quadrupolo= 150°C, full scan: 35-550 amu

Os resultados, praticamente idênticos, mostraram, para todas as fibras, mostraram que uma hora de exposição permitiu ligeira melhoria na resolução dos picos entre C₁₄ e C₁₆ e respectivos hidrocarbonetos ramificados, sendo o C₂₀ somente visível com duas horas de exposição da fibra; os restantes hidrocarbonetos lineares foram claramente visíveis e identificáveis com tempos mais curtos de exposição. Assim, o tempo de exposição de uma hora foi o utilizado para amostras deste tipo.

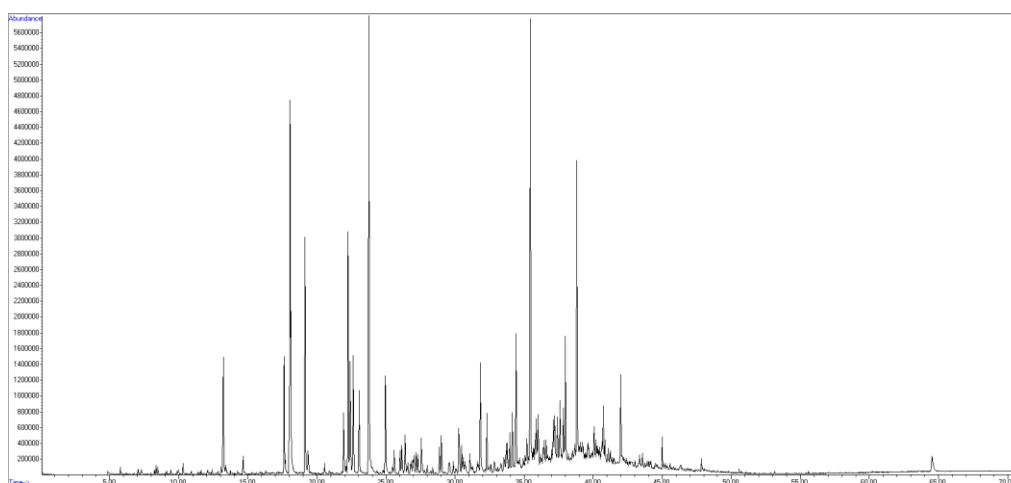


Figura 3.4 - GC-MS de Gasolina 95 usando SPME (CAR/PDMS) e 30 minutos de exposição na coluna SLB-5ms. Condições: 35°C (5min) -> 260°C (10min), 4°C, Split 1/20, Temp. Injector= 270°C, Temp. Ionização= 230°C, Temp. Quadrupolo= 150°C, full scan: 35-550 amu

Repetindo os mesmos ensaios com Gasolina 95 (Figura 3.4), obteve-se as mesmas conclusões que com o Gasóleo: tempos maiores de exposição originaram pequenos incrementos na intensidade dos picos, sem afectar a qualidade da separação. No entanto, no caso da Gasolina 95, uma hora de extracção originou saturação das fibras com alguns compostos; por este motivo, os 30 minutos de exposição (Figura 3.4) foram considerados como os que produziram melhor separação.

Para todas as fibras estudadas, os resultados com 5 minutos de tempo de exposição, para ambas as amostras, produziram cromatogramas com informação insuficiente para identificação; os tempos intermédios originaram cromatogramas em que todos os compostos puderam ser identificados pela

biblioteca de compostos, indicando, portanto, que podem eventualmente ser utilizados, caso haja necessidade de agilizar os tempos da metodologia.

3.1.3 Temperatura de Exposição

A utilização de temperatura durante a exposição da fibra permite o aumento da volatilização dos compostos, criando um *headspace* mais rico em analitos. No entanto, as fibras de SPME sofrem perdas de analito ao serem expostas a temperatura. Fenômenos de competição entre os diferentes analitos resultam deste mecanismo, sendo os analitos mais voláteis substituídos pelos menos voláteis com o aumento da temperatura (Figura 3.5). Por outro lado, na ausência de temperatura, o processo de *headspace* cessa de ser eficaz com compostos com massa molecular superior, a partir do C₁₃, originando um cromatograma não-conforme com o perfil padrão de hidrocarbonetos associado ao Gasóleo; não ocorre a volatilização e consequente retenção na fibra dos hidrocarbonetos menos voláteis. Para os combustíveis compostos maioritariamente por hidrocarbonetos de elevada massa molecular, como o gasóleo ou petróleo, a ausência de temperatura durante a exposição da fibra de SPME não é viável.

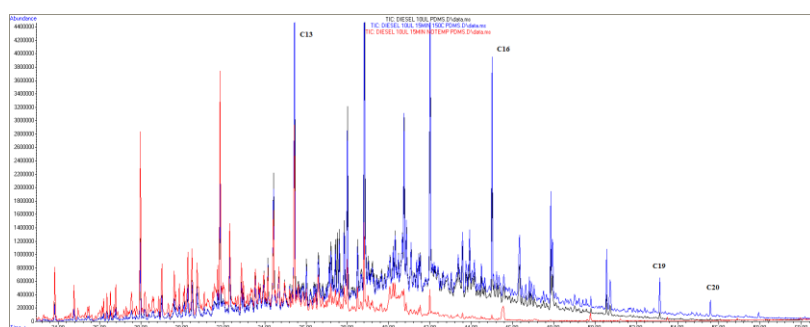


Figura 3.5 - GC-MS de Gasóleo: 15 minutos de exposição da fibra PDMS com 54°C (preto), 88°C (azul) e temperatura ambiente (vermelho) (cromatograma parcial) na coluna SLB-5ms. Condições: 35°C (5min) -> 260°C (10min), 4°C, Split 1/20, Temp. Injector= 270°C, Temp. Ionização= 230°C, Temp. Quadrupolo= 150°C, full scan: 35-550 amu

No caso dos (mesmos) ensaios com gasolina (Figura 3.6), verificou-se não existirem perdas consideráveis à temperatura ambiente no perfil cromatográfico. Isto significa que a SPME pode ser utilizada sem temperatura na análise dos hidrocarbonetos mais voláteis, eliminando a possibilidade de mecanismos de competição entre analitos de matrizes complexas.

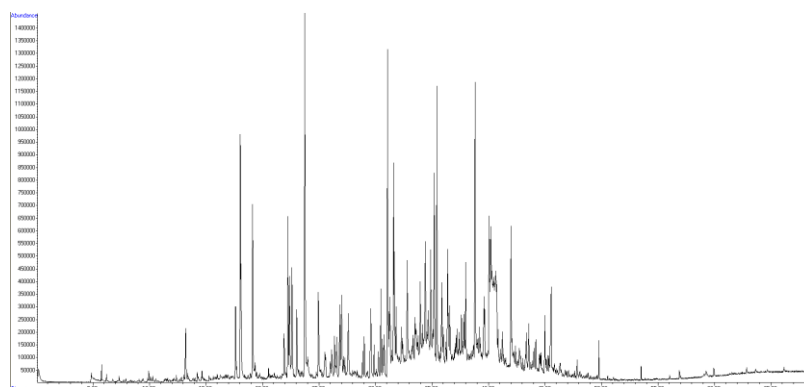


Figura 3.6 - GC-MS de Gasolina 95: SPME (CAR/PDMS) (15 minutos) à temperatura ambiente na coluna SLB-5ms. Condições: 35°C (5min) -> 260°C (10min), 4°C, Split 1/20, Temp. Injector= 270°C, Temp. Ionização= 230°C, Temp. Quadrupolo= 150°C, full scan: 35-550 amu

3.2 Análise Cromatográfica

No presente trabalho, para a análise cromatográfica de produtos derivados do petróleo, foram escolhidas quatro fases estacionárias RTIL contendo o mesmo anião – bis(trifluorometilsulfonyl)imida – e diferentes catiões. A SLB_{TM}-IL60 e SLB_{TM}-IL76 possuem ambas base fosfônica, 1,12-di(tripropilfosfonio)dodecano e tri(tripropilfosfoniohexanamido)triethylamina respectivamente, e a SLB_{TM}-IL82 e SLB_{TM}-IL100 possuem ambas base imidazólica, 1,12-di(2,3-dimetilimidazólio)dodecano e 1,9-di(3-vinylimidazólio)nonano, respectivamente. Assim, quaisquer alterações de selectividade deverão ser ditadas pelos diferentes catiões e as suas interações com os compostos de interesse. Segundo a literatura^{75,100}, a ligação (única) entre estes iões está na origem da multiplicidade de interações existentes; nomeadamente, o anião condiciona a solubilização e selectividade a um maior nível, enquanto que o catião condiciona as interações através de electrões π não ligantes.⁷⁰ Anteriormente aos ensaios cromatográficos, atendendo à ausência de polaridade dos hidrocarbonetos, pressupôs-se que a IL60 teria melhor selectividade pois o seu catião é apolar, prevalecendo as interações de dispersão, enquanto que as interações das restantes colunas com catiões polares (dipolares, ligações de hidrogénio, iónicas) melhorariam a selectividade para analitos polares⁷³, havendo assim pior separação no caso dos hidrocarbonetos. No entanto, devido à multitude de interações possíveis, não é possível prever com certeza o comportamento das fases estacionárias de líquidos iónicos, concluindo-se apenas que apesar do carácter polar de todas as colunas, a estrutura do catião é determinante para a eficiência de separação dos analitos.

Os primeiros ensaios do desenvolvimento de método cromatográfico foram efectuados na coluna IL76, que se demonstrou imediatamente inadequada para as matrizes de hidrocarbonetos, sendo impossível desenvolver uma metodologia adequada para a separação. Apesar de terem sido testadas várias condições, não foi possível separar e/ou identificar qualquer pico na mistura Naftaleno, Undecano e Eicosano. Desta forma, foi excluída.

3.2.1 Colunas HP-5ms e SLB₅ms

A fase estacionária de poli(difenildimetilsiloxano), coluna HP-5ms, foi utilizada no GC-FID pela sua proximidade à SLB-5ms (utilizada nos ensaios de GC-MS), coluna com características apolares. A ordem de eluição dos compostos nestas colunas é baseada em forças de Van der Waals (interações dispersivas) devido à sua composição química, o que leva a que a separação seja condicionada pelas temperaturas de ebulição. Tradicionalmente, estas colunas são muito utilizadas na análise cromatográfica de hidrocarbonetos (por GC-MS), devido a serem bastante inertes e possuírem pouco *bleeding*, o que permite utilizar temperaturas elevadas por longos períodos de tempo durante a realização de programas cromatográficos longos.

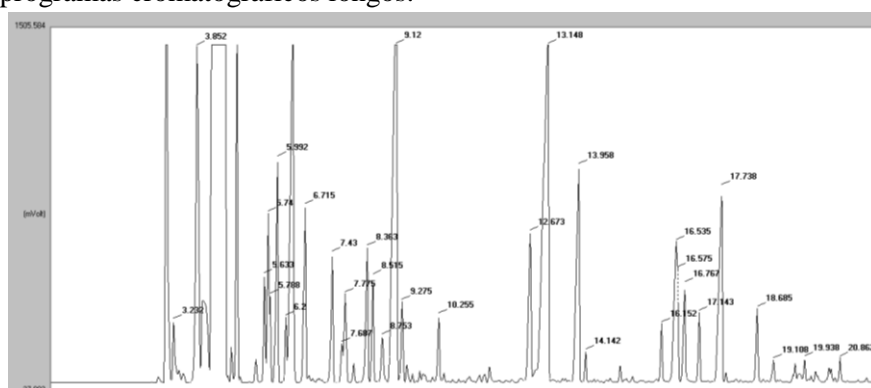


Figura 3.7 - GC-FID de Gasolina 95 (cromatograma parcial) na coluna HP-5ms. Condições: 35°C (5min) -> 260°C (10min), 4°C/min, Split 1/20, Temp. Injector= 290°C, Temp. Detector=290°C

Analisando as Figuras 3.7 e 3.8, podemos observar que não existem diferenças imediatamente óbvias entre a separação efectuada nestas duas colunas apolares. Ambas apresentam picos finos, focados, à excepção da saturação apresentada aos 4 segundos na HP-5ms (sinal com o máximo recto).

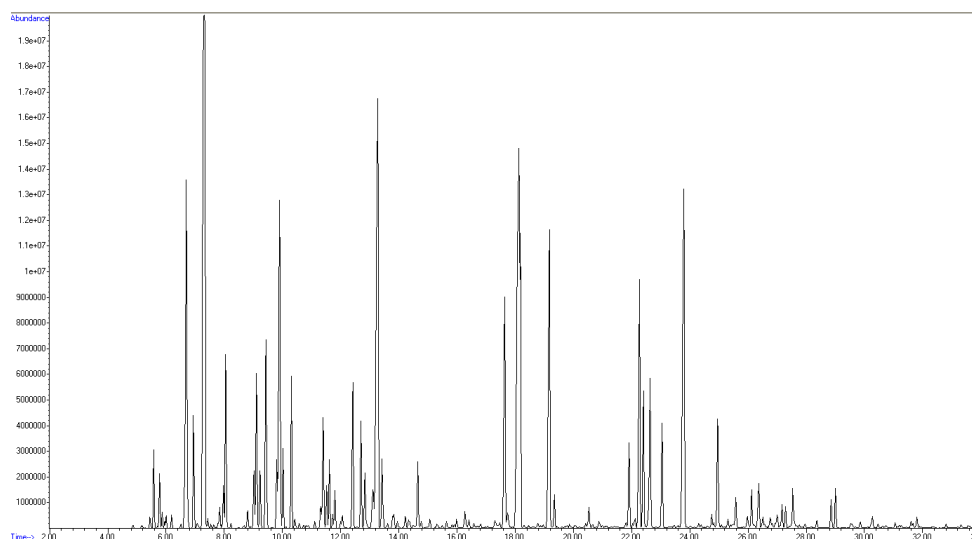


Figura 3.8 - GC-MS de Gasolina 95 na coluna SLB-5ms. Condições: 35°C (5min) -> 260°C (10min), 4°C, Split 1/20, Temp. Injector= 270°C, Temp. Ionização= 230°C, Temp. Quadrupolo= 150°C, full scan: 35-550 amu

Sem mais informação detalhada, é assim possível confirmar a informação dos fabricantes, que apresentam uma “equivalência” entre ambas as fases estacionárias. Assim, desta forma, a HP-5ms foi tomada como referência na comparação da separação efectuada pelas colunas de líquidos iónicos.

3.2.2 Coluna SLB-IL60

Nos ensaios preliminares, a coluna IL60, como expectável, apresentou bons resultados na separação de todos os padrões testados. Nomeadamente o pristano (Figura 3.9), originou um pico fino, com boa resolução. Picos similares foram obtidos para todos os padrões testados, sem *tailing* e apresentando *fronting* mínimo - como referido anteriormente, estes fenómenos derivam das interações únicas entre os anião e catião da fase estacionária e o analito.

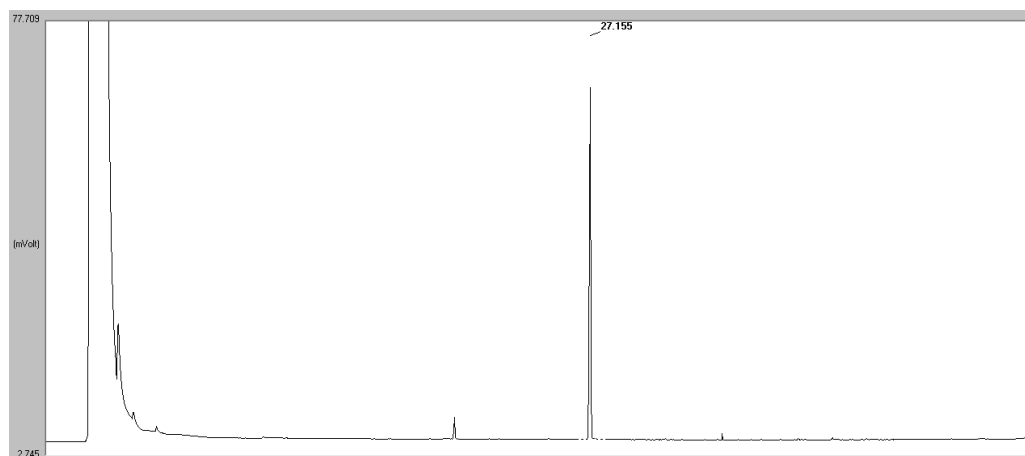


Figura 3.9 - GC-FID do Pristano na Coluna IL60. Condições: 35°C (5min) -> 260°C (10min), 4°C/min, Split 1/20, Temp. Injector= 290°C, Temp. Detector=290°C

Na análise de amostras de combustíveis, a IL60 apresentou uma qualidade de separação dos compostos comparável à da HP-5ms (Figura 3.10), particularmente no caso do Gasóleo, possuindo a vantagem de reduzir os tempos de retenção sem comprometer muito a análise ou originar coeluição dos analitos. Foi notado que três picos com tempos de retenção de 44.073s, 44.668s e 45.465s, foram melhor separados pela IL60 do que pela HP-5ms; os compostos foram identificados (por GC-MS) como sendo os FAMES (Ésteres Metílicos de Ácidos Gordos) provenientes da percentagem de biodiesel adicionada ao gasóleo comercial. Estes três picos claramente visíveis, coeluem a 48.5s na coluna HP-5ms; seria expectável que uma coluna com fenómenos maioritariamente dispersivos não conseguisse separar ésteres metílicos. Segundo o fabricante¹⁰¹, a IL60 possui capacidade de separação de isómeros *cis/trans* dos FAME; não sendo este o tema desta dissertação, não se prosseguiu esta linha de investigação, mas o potencial desta separação estereoisomérica das colunas de líquidos iónicos não deixou de ser notado.

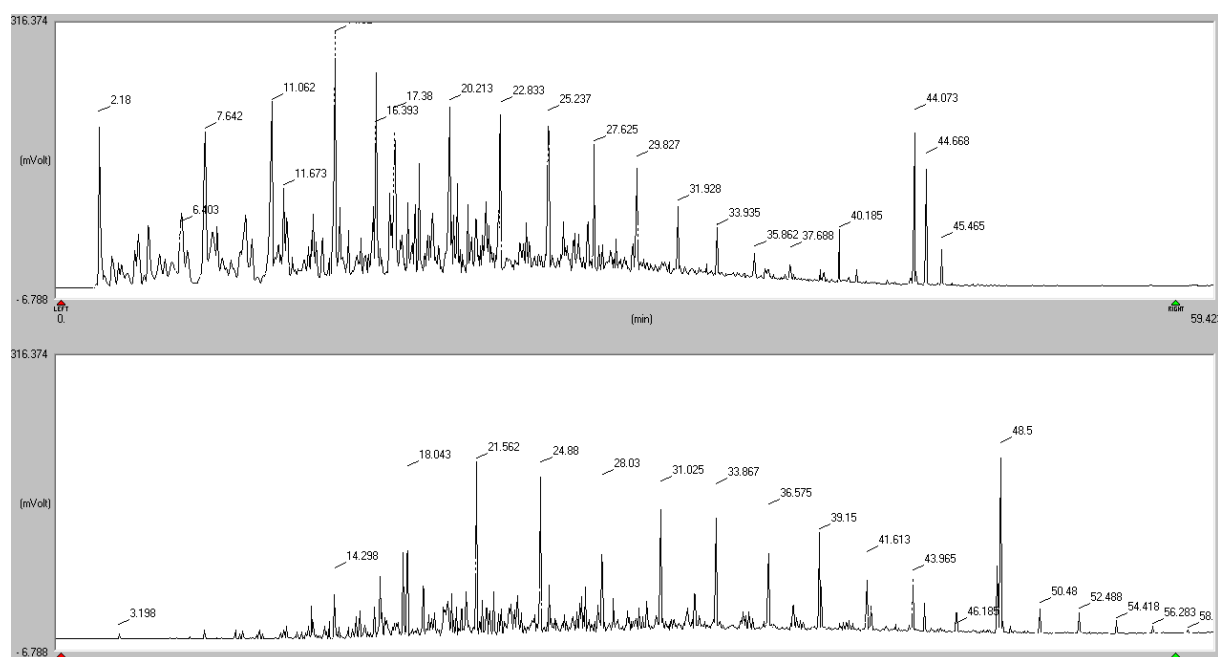


Figura 3.10 - GC-FID comparativo de Gasóleo Simples: coluna IL60 (cromatograma superior) e HP-5ms (cromatograma inferior). Condições: 35°C (5min) -> 260°C (10min), 4°C/min, Split 1/20, Temp. Injector= 290°C, Temp. Detector=290°C

3.2.3 Coluna SLB-IL82

A coluna IL82 apresentou os piores resultados analíticos das colunas de líquidos iónicos: picos indistintos com coeluição, baixa sensibilidade e elevadas interferências na linha de base, possivelmente devido a resolução ineficiente dos hidrocarbonetos aromáticos e dos ramificados que possuem menor intensidade do que os lineares.

O cromatograma da amostra de Gasóleo desvia-se do padrão típico apresentado pelos seus hidrocarbonetos lineares na coluna HP-5ms e IL60, a indefinição dos picos impossibilita qualquer tipo de identificação. Tendo em conta a polaridade mais elevada da IL82, em comparação com a IL60 e a HP-5ms, a incapacidade de separação surge como previsível. No entanto, tal como a IL60, a IL82 separou eficazmente os três FAMES presentes no gasóleo, apesar do desenvolvimento do método não incidir no estudo destes compostos (Figura 3.11).

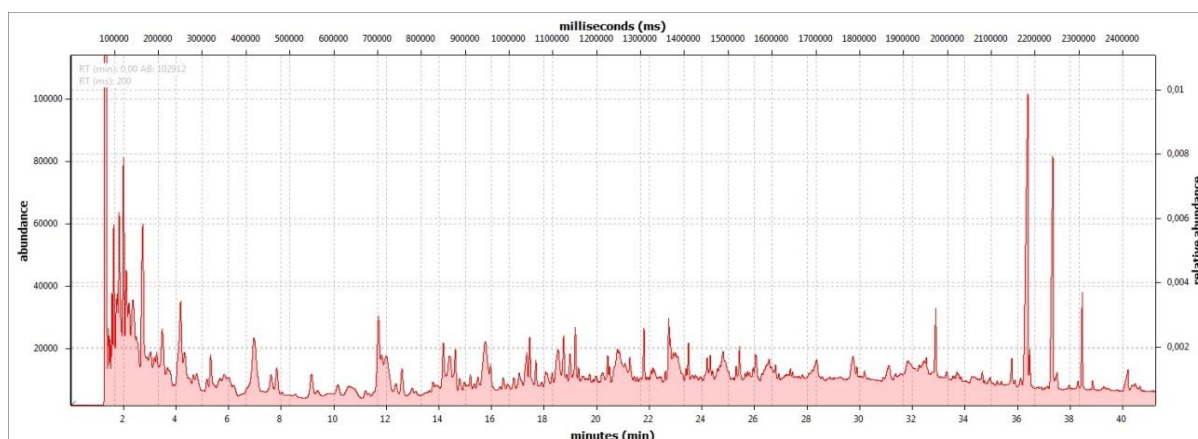


Figura 3.11 - GC-FID de Gasóleo na Coluna IL82. Condições: 50°C (10min) -> 260°C (10min), 5°C/min, Split 1/20, Temp. Injector= 270°C, Temp. Detector=270°C

Para a Gasolina 95 (Figura 3.12), foi possível identificar picos mais estreitos e individualizados, sem aparente coeluição; no entanto, existe um forte *tailing*, o que se traduz numa resolução ineficaz. Tendo em conta o baixo ponto de ebulição de muitos dos compostos-alvo da gasolina (BTEX) e a temperatura inicial que a coluna requer (50°C), a IL82 não se mostra como a mais adequada para a análise de hidrocarbonetos com baixo ponto de ebulição.

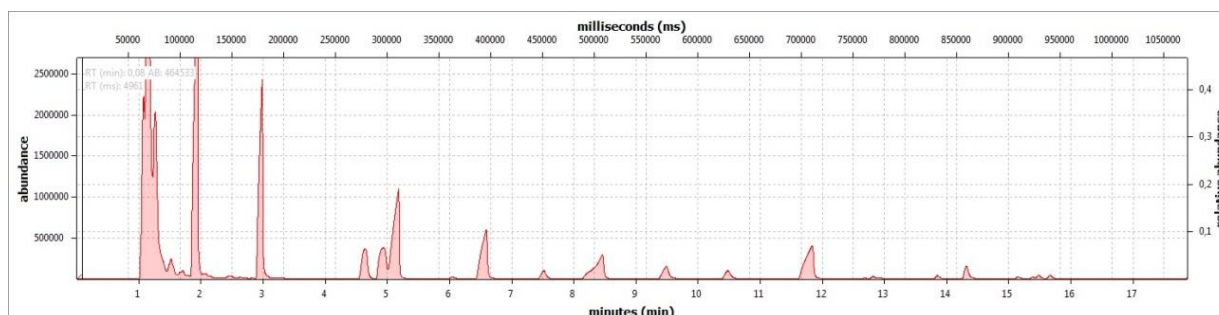


Figura 3.12 – GC-FID de Gasolina 95 na Coluna IL82. Condições: 50°C (10min) -> 260°C (10min), 5°C/min, Split 1/20, Temp. Injector= 270°C, Temp. Detector=270°C

Cromatogramas análogos repetiram-se com todas as amostras, com elevado *tailing* e coeluição. Por este motivo, considera-se que a SLB-IL82 não tem a polaridade, selectividade nem limites de temperatura adequados à análise de hidrocarbonetos em combustíveis, sendo assim considerada como coluna inaqueada para estudos analíticos destas matrizes.

3.2.4 Coluna SLB-IL100

A coluna IL100, a mais polar das colunas testadas, apresentou uma boa resolução com vários padrões, com picos finos e simétricos. Isto foi especialmente evidente nos compostos aromáticos derivados do benzeno, como é possível constatar na figura 3.13. No entanto, nos hidrocarbonetos de baixa massa molecular, esta separação foi pouco eficiente, devido à elevada polaridade da coluna. Os compostos apolares de baixa massa coeluem com o solvente, conforme evidenciado pela enorme saturação (ver Figura 3.14) do pico a 2.5s.

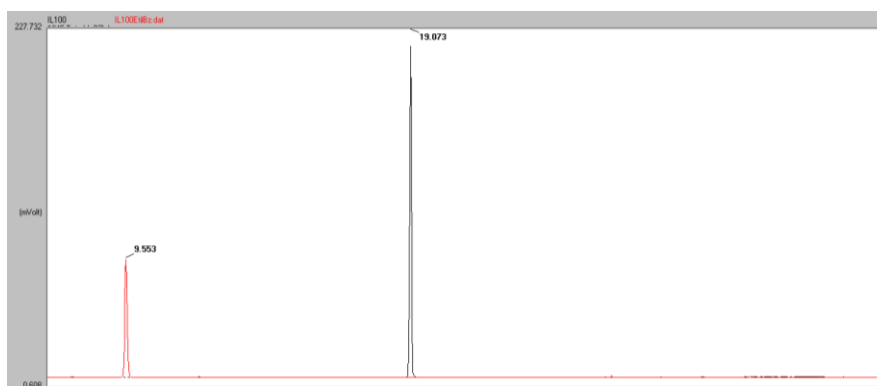


Figura 3.13 - GC-FID do etilbenzeno (vermelho) e 1,2,4,5-tetrametilbenzeno (preto) na coluna IL100. Condições: 35°C (5min) -> 230°C (10min), 4°C/min, Split 1/20, Temp. Injector= 250°C, Temp. Detector=250°C

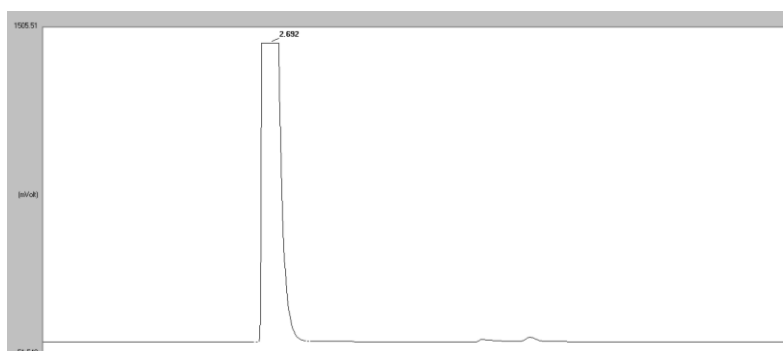


Figura 3.14 - GC-FID de Undecano na coluna IL100. Condições: 35°C (5min) -> 230°C (10min), 4°C/min, Split 1/20, Temp. Injector= 250°C, Temp. Detector=250°C

As conclusões da observação dos padrões foram corroboradas pela análise de Gasóleo simples (Figura 3.15); o cromatograma praticamente não apresenta picos com resolução suficiente para a identificação e têm um aspecto completamente distinto da distribuição gaussiana dos sinais de hidrocarbonetos observados na HP-5ms e na IL60. Foram testadas outras condições cromatográficas distintas das apresentadas na Tabela 2.2, mas ainda assim a IL100 não separou adequadamente os hidrocarbonetos lineares.

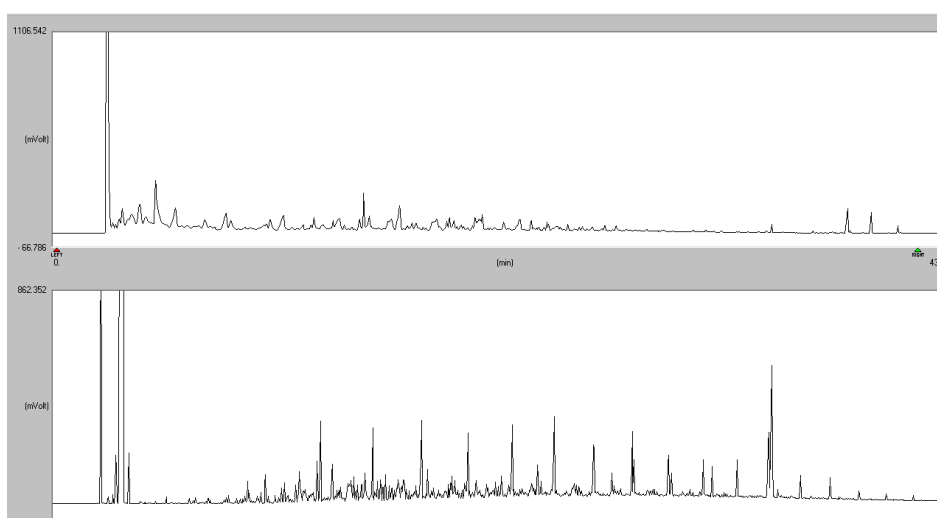


Figura 3.15 - Comparação analítica GC-FID de Gasóleo Simples nas colunas IL100 (cromatograma superior) e HP-5ms (cromatograma inferior). Condições: IL100 35°C (5min) -> 230°C (10min), 4°C/min, Split 1/20, Temp. Injector= 250°C, Temp. Detector=250°C. HP-5ms 35°C (5min) -> 260°C (10min), 4°C/min, Split 1/20, Temp. Injector= 290°C, Temp. Detector=290°C

3.3 Identificação de Biomarcadores

3.3.1 Determinação aquiral

Para determinação do potencial analítico qualitativo das técnicas estudadas, as várias amostras foram comparadas com as de padrões dos biomarcadores. Devido aos fracos resultados apresentados durante o desenvolvimento do método, a coluna IL82 foi excluída desta parte do estudo por não apresentar cromatogramas com informação suficiente ou passível de ser caracterizada com recurso a padrões.

A análise efectuada por GC-MS com a coluna SLB-5ms, foi utilizada para identificar as ordens de eluição utilizando padrões (ao invés da biblioteca NIST). A figura 3.16 mostra um dos exemplos, a correspondência de três padrões aromáticos da Gasolina 95; os mesmos dezassete padrões (1,2,3,5-Tetrametilbenzeno, 1,2,4,5-Tetrametilbenzeno, 1,2,3-Trimetilbenzeno, 1,2,4-Trimetilbenzeno, 2,6,10,14-Tetrametilpentadecano (Pristano), 2,6,10,14-Tetrametilhexadecano (Fitano), Etilbenzeno, 2-Etiltolueno, 3-Etiltolueno, 4-Etiltolueno, Undecano, Eicosano, *m*-Xileno, *o*-Xileno, Naftaleno, Propilbenzeno e Tolueno) foram sobrepostos a todas as seis amostras (Gasolina 95 comercial, Gasóleo Simples comercial, Combustível de Avião, Petróleo comercial, Petróleo de Iluminação Comercial e Diluente comercial (em lata)).

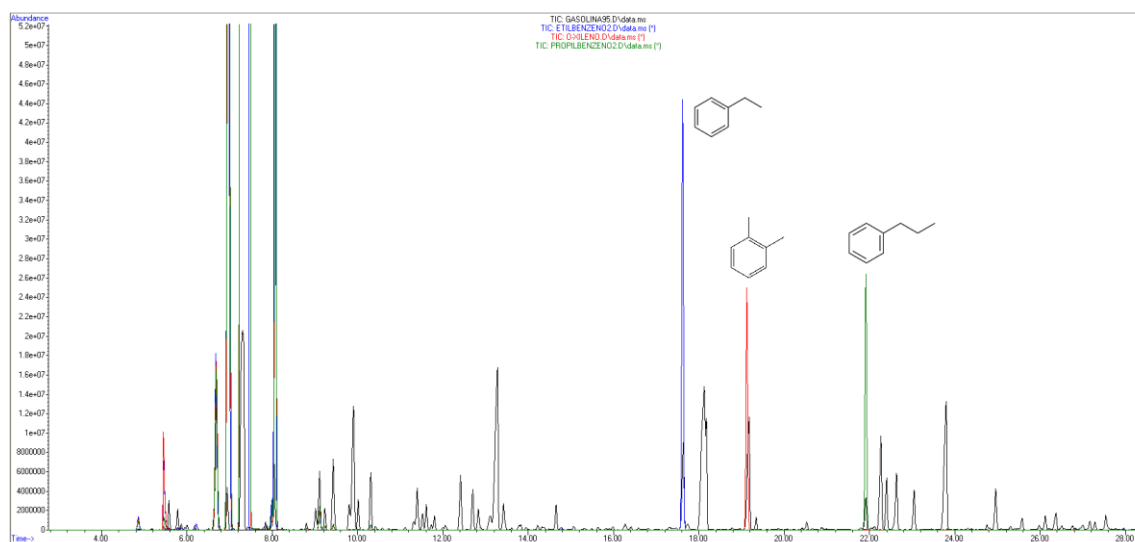


Figura 3.16 - GC-MS de Gasolina 95 (Preto) e comparação/sobreposição aos padrões aromáticos de etilbenzeno (azul), orto-xileno (vermelho) e propilbenzeno (verde) na coluna SLB-5ms. Condições: 35°C (5min) -> 260°C (10min), 4°C, Split 1/20, Temp. Injetor= 270°C, Temp. Ionização= 230°C, Temp. Quadrupolo= 150°C, full scan: 35-550 amu

O segundo ensaio confirmatório foi feito na coluna HP-5ms por GC-FID, apresentando a mesma ordem de eluição que a SLB-5ms, como expectável. Os terceiros ensaios foram executados na IL60 e, por último, utilizou-se a IL100, apesar das reservas devido à sua excessiva polaridade e pouca interação com os compostos de baixa massa molecular.

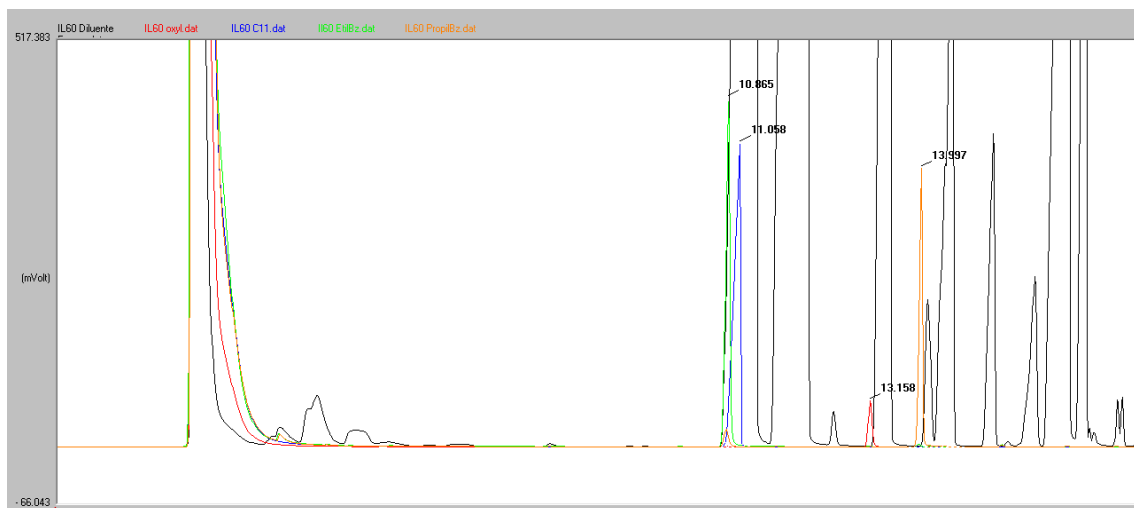


Figura 3.17 - Sobreposição dos cromatogramas GC-FID de Diluente (Preto), Etilbenzeno (Verde), Undecano (Azul), *o*-xileno (vermelho) e Propilbenzeno (laranja) na coluna IL60. Condições: 35°C (5min) -> 260°C (10min), 4°C/min, Split 1/20, Temp. Injector= 290°C, Temp. Detector=290°C

A figura 3.17 permite observar a coeluição do Etilbenzeno com o Undecano na amostra de Diluente, sendo que com o presente método cromatográfico não foi possível separar estes dois analitos para identificação e quantificação, embora os restantes analitos tenham uma resolução que permite a sua identificação inequívoca. O teste com diferentes matrizes contendo hidrocarbonetos permite constatar que não existe um método cromatográfico que garanta resultados perfeitos em todas as amostras. Para quantificação dos hidrocarbonetos aromáticos em destilados de petróleo (similar à técnica ASTM UOP744-06: *Aromatics in Hydrocarbons by GC*) seria necessário otimizar o programa de temperatura de forma a separar o número de analitos que coeluíram.

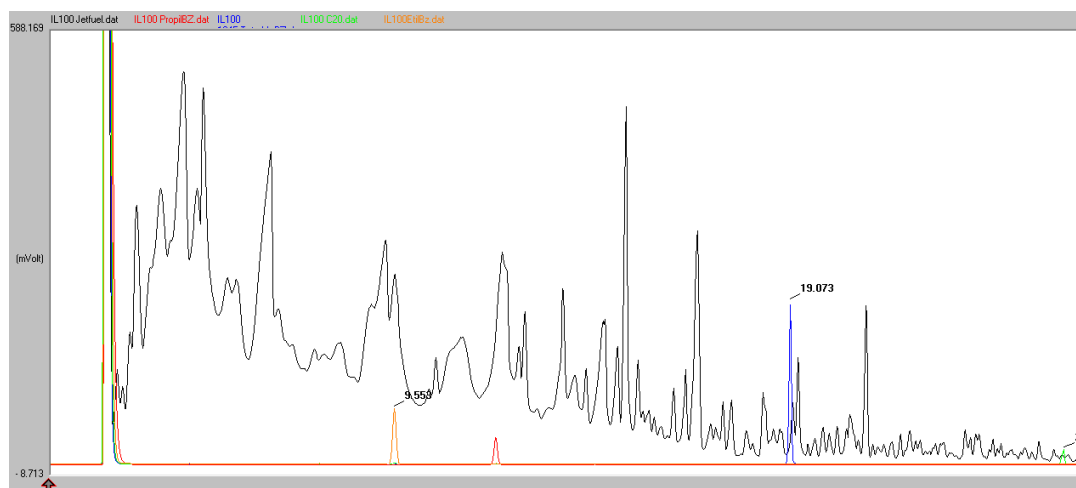


Figura 3.18 – Sobreposição de Cromatogramas GC-FID de Combustível de Avião (Preto), Etilbenzeno (Laranja), Propilbenzeno (Vermelho), 1,2,4,5-tetrametilbenzeno (Azul) e Icosano (Verde) na coluna IL100. Condições: 35°C (5min) -> 230°C (10min), 4°C/min, Split 1/20, Temp. Injector= 250°C, Temp. Detector=250°C

No exemplo da figura 3.18, demonstramos novamente que a polaridade excessiva da IL100 não permite uma boa separação das matrizes contendo hidrocarbonetos, embora produza picos focados e simétricos para todos os padrões (à exceção do undecano).

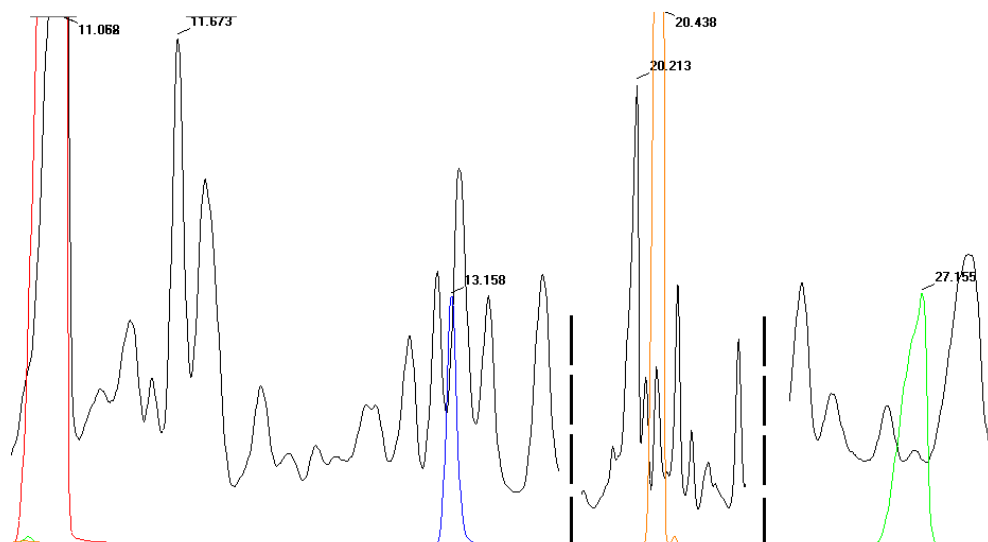


Figura 3.19 - Análise sobreposta GC-FID de Gasóleo Simples (Preto), Undecano (Vermelho), *o*-xileno (Azul), 1,2,4,5-tetrametilbenzeno (Laranja) e Pristano (Verde) na coluna IL60. Condições: 35°C (5min) -> 260°C (10min), 4°C/min, Split 1/20, Temp. Injector= 290°C, Temp. Detector=290°C

A figura 3.19, por seu lado, apresenta uma identificação bem-sucedida, suportando a hipótese inicial de que a IL60, pela sua polaridade mais baixa, teria capacidade de fazer separação de hidrocarbonetos. De notar o formato irregular do pico de Pristano; pressupõe-se que seja uma separação incompleta dos estereoisómeros do Pristano, tendo em conta o já referido potencial desta fase de líquidos iónicos nas separações estereoisoméricas.

Conforme referido no capítulo 1.4.2.1, existem alterações na ordem de eluição de alguns analitos devido aos múltiplos mecanismos de interacção com os líquidos iónicos. Esta situação verificou-se com o undecano. Nas colunas HP e SLB-5ms, verificámos a ordem de eluição etilbenzeno>*o*-xileno>propilbenzeno>undecano; na IL60, esta ordem foi etilbenzeno>undecano>*o*-xileno>propilbenzeno, com o undecano e o etilbenzeno quase em coeluição; e na IL100 passou a ser undecano>etilbenzeno> *o*-xileno >propilbenzeno, com o undecano a sair na frente de solvente, sendo impossível de identificar (Figura 3.20).

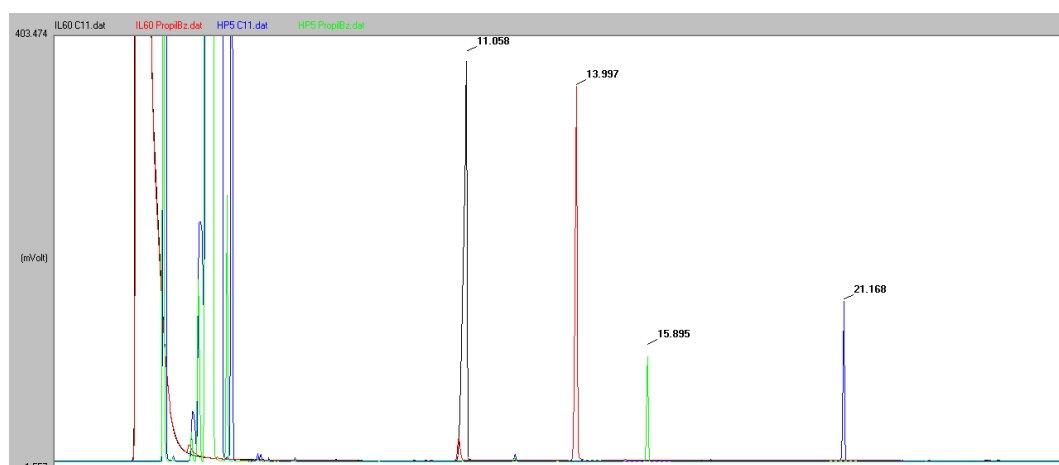


Figura 3.20 - Comparação GC-FID da ordem de eluição do Undecano e Propilbenzeno (Preto e Vermelho) na colunas IL60 e HP-5ms (Azul e Verde). Condições: 35°C (5min) -> 260°C (10min), 4°C/min, Split 1/20, Temp. Injector= 290°C, Temp. Detector=290°C

Noutros ensaios, verificámos que o padrão linear eicosano (C_{20}), não sofre inversões na eluição, mantendo a ordem Pristano>Fitano>Eicosano nas três colunas. Ainda assim, deveriam ser feitos ensaios nas mesmas condições com outros hidrocarbonetos próximos ao undecano para verificar que outras alterações à ordem de eluição ocorrem com as fases estacionárias de líquidos iónicos.

No geral, foi considerado que o método cromatográfico desenvolvido foi adequado para a identificação qualitativa de biomarcadores e separação de várias matrizes de combustíveis, apesar das limitações específicas de cada coluna. Para quesitos do tipo “Presença ou Ausência Qualitativa”, a IL60 demonstrou uma qualidade de separação muito similar às colunas convencionais SLB e HP-5ms; a IL100, embora tenha demonstrado algumas fragilidades a nível da separação dos hidrocarbonetos de cadeia mais curta, demonstra potencial com futuras optimizações do método cromatográfico para alguns compostos.

3.3.2 – Análise com coluna cromatográfica quiral

Para a análise quiral, foi necessário desenvolver uma nova metodologia que permitisse a separação dos compostos, sem originar a degradação da fase estacionária. As colunas de ciclodextrina são particularmente sensíveis e perdem a sua integridade com temperaturas elevadas ou na presença de humidade; sendo a temperatura máxima de operação da Chirasil Dex de 200°C, era expectável que existissem constrangimentos a nível da separação de alguns dos hidrocarbonetos, nomeadamente, o Pristano que possui um ponto de ebulição de 298°C. No entanto, como as fases estacionárias quirais não possuem mecanismos de dispersão dominantes, fazendo a separação maioritariamente por inclusão na estrutura toroidal, como explicado no capítulo 1.4.2.2, a separação ocorreu com algum sucesso.

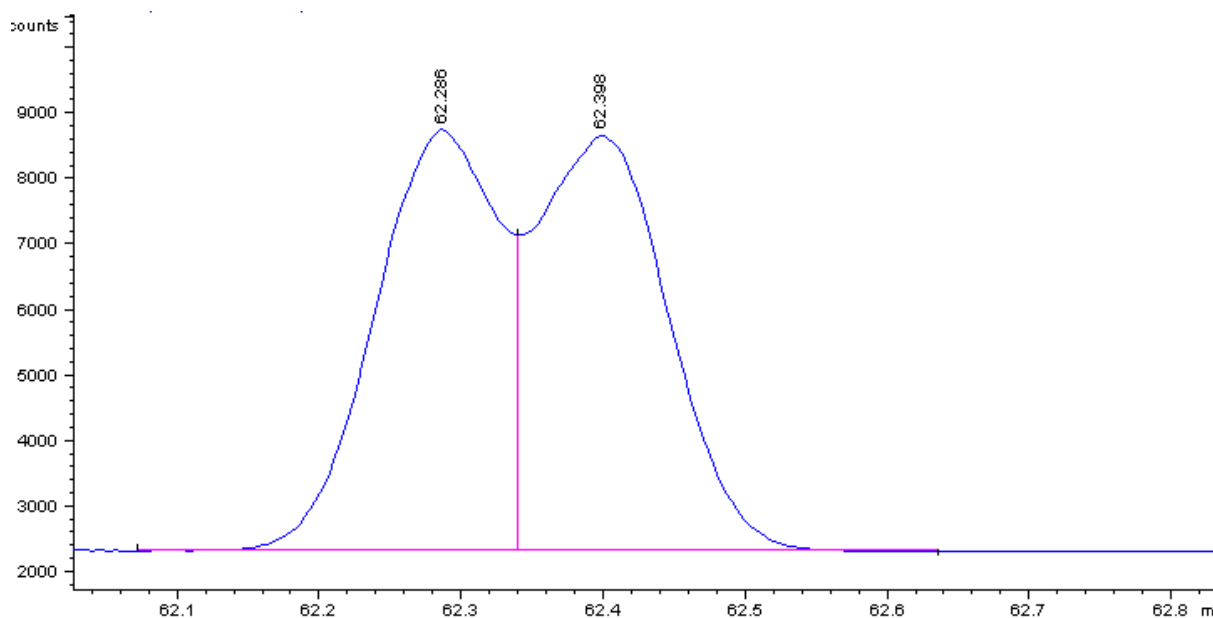


Figura 3.21 – GC-FID dos epímeros de Pristano na coluna quiral Chirasil Dex. Condições: 70°C (5min) -> 190°C (10min), 1.5°C/min, Split 1/20, Temp. Injector= 260°C, Temp. Detector=270°C

Várias temperaturas testadas demonstraram que a separação quiral dos estereoisómeros do Pristano é fortemente influenciada por pequenas mudanças, como a alteração da rampa de temperatura do forno de 1.5°C/min para 2°C/min (esta última não permitiu a separação). Assim, as condições que permitiram a separação foram: temperatura do forno programada de 70°C a 190°C, com rampa de incrementos de 1.5°C/min, com isotérmica inicial de 5 minutos e final de 10 minutos, totalizando 95 minutos (Figura 3.21). O injetor esteve programado para os 260°C e o detector para 270°C, utilizando Hidrogénio como gás de arraste a um fluxo de 1mL/min, em modo split com rácio de 1/20.

Foram realizados testes com injeção de analito diluído em pentano, injectando volumes de 0.2µL e posteriormente de 0.1µL. No entanto, verificaram-se alterações como alargamento dos picos, mudanças consideráveis dos tempos de retenção entre injeções e mais interferências com ambos os volumes, não possuindo uma reprodutibilidade aceitável entre injeções. A alteração do método de preparação de amostra para SPME permitiu ultrapassar este problema, levando à conclusão de que devido aos mecanismos de inclusão molecular, a capacidade de carga da coluna (massa ou volume de amostra para a qual a coluna consegue efectuar 90% da separação) é muito baixa e que a injeção de analito com solvente interfere na capacidade de carga da coluna, impedindo a separação cromatográfica. De acordo com os fenómenos de inclusão, é necessário que uma molécula seja acolhida no interior do toróide da ciclodextrina, e posteriormente libertada; devido ao volume de pentano presente na injeção, a ciclodextrina não mostrou capacidade para realizar este processo de forma adequada.

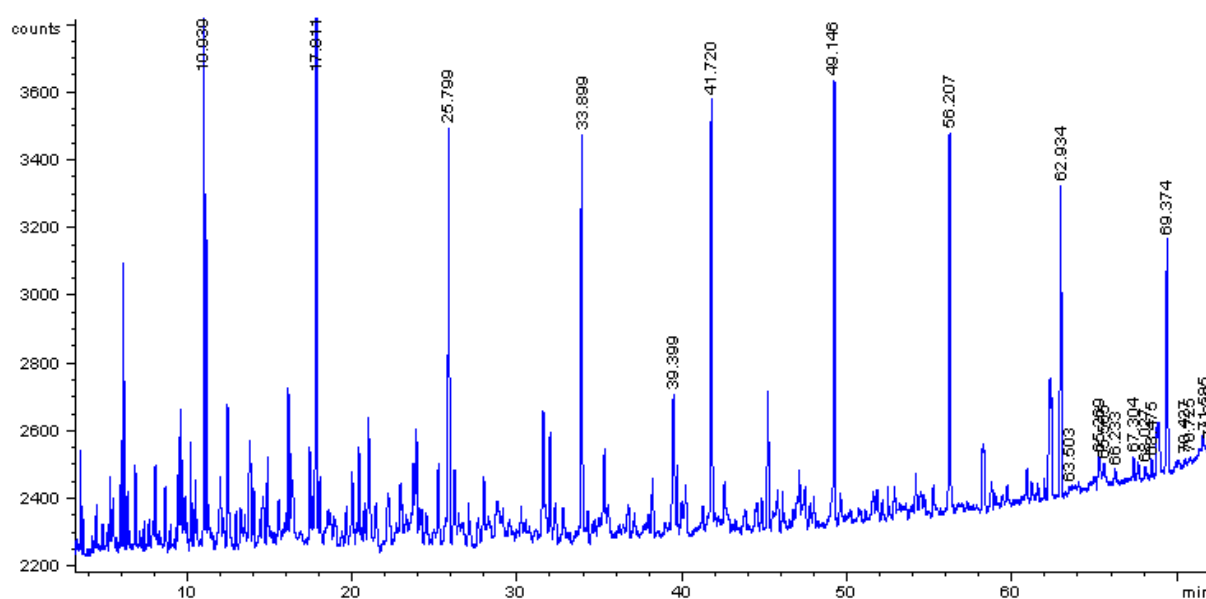


Figura 3.22 - GC-FID de uma amostra de Gasóleo Simples na coluna quiral Chirasil Dex. Condições: 70°C (5min) -> 190°C (10min), 1.5°C/min, Split 1/20, Temp. Injetor= 260°C, Temp. Detector=270°C

Apesar da fase estacionária de CD ter por objectivo a separação de compostos quirais, verificou-se que a coluna separa adequadamente os hidrocarbonetos lineares presentes no Gasóleo (Figura 3.22), mantendo a distribuição gaussiana aproximada e com picos estreitos, havendo também boa definição nos hidrocarbonetos ramificados e cíclicos. Apesar de necessitar de estudos confirmatórios quanto à separação dos hidrocarbonetos aromáticos, a coluna Chirasil Dex é assim apropriada para a separação do Gasóleo e posterior datação por rácio de Pristano/*n*-C₁₇ e Fitano/*n*-C₁₈, tendo potencial para análise de alguns componentes aquirais, para além dos quirais.

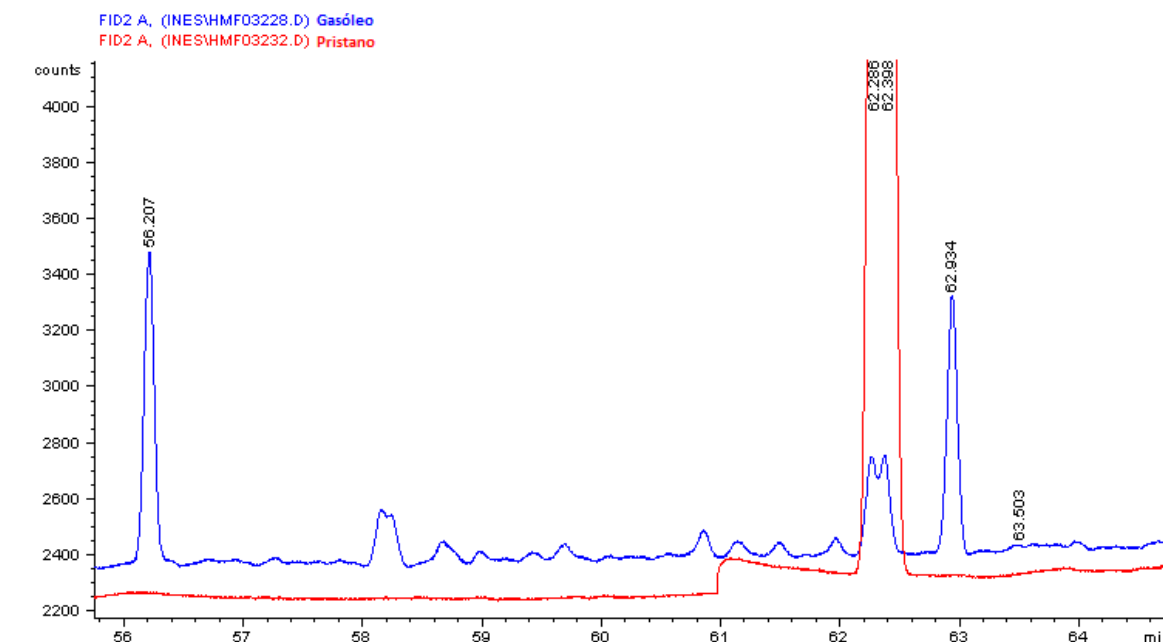


Figura 3.23 – Análise sobreposta GC-FID de Gasóleo Simples (Azul) ao Pristano (Vermelho) na coluna quiral Chirasil Dex. Condições: 70°C (5min) -> 190°C (10min), 1.5°C/min, Split 1/20, Temp. Injector= 260°C, Temp. Detector=270°C

A separação dos epímeros de Pristano, com o programa de temperaturas escolhido, foi possível também na amostra de gasóleo como mostrado na Figura 3.23 através da sobreposição com o padrão.

A identificação do Fitano, no entanto, apresentou algumas inconsistências (Figura 3.24). O primeiro facto a notar é o tempo de retenção inferior ao do Pristano, que é contrário ao previsível tendo em conta os pontos de ebulição, mas de acordo com os tempos de retenção observados na coluna IL60. Esta alteração deve-se possivelmente ao aumento do tamanho da molécula (mais um carbono) e a existência de um terceiro centro estereogénico, criando impedimentos estereoquímicos nas zonas de inclusão das ciclodextrinas e por isso sendo menos retido pela fase estacionária do que o Pristano.

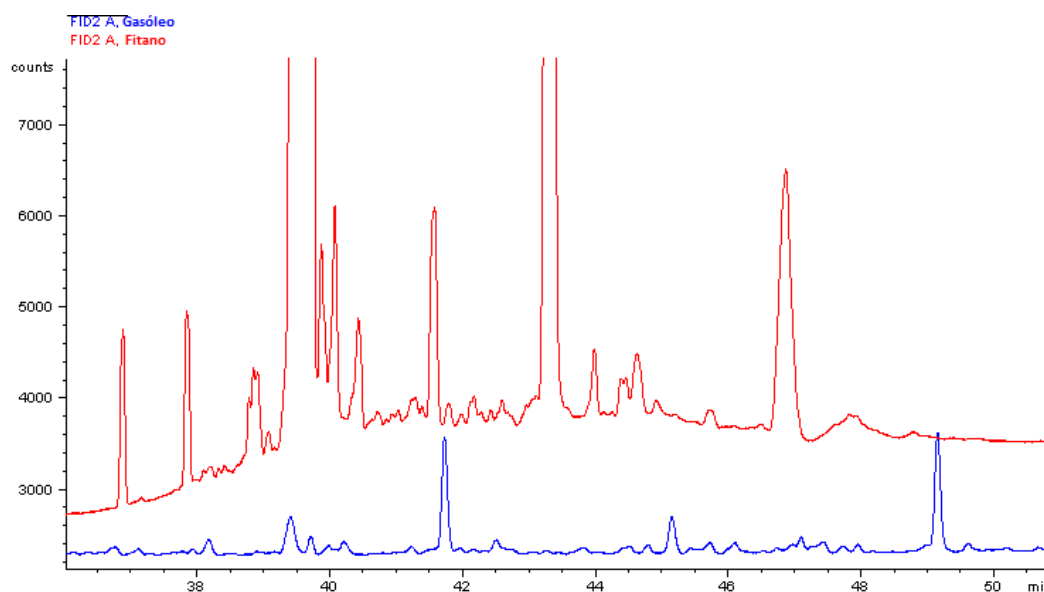


Figura 3.24 – Sobreposição de cromatogramas GC-FID de Gasóleo Simples (Azul) e Fitano (Vermelho) na coluna quiral Chirasil Dex. Condições: 70°C (5min) -> 190°C (10min), 1.5°C/min, Split 1/20, Temp. Injector= 260°C, Temp. Detector=270°C

Como é possível observar na Figura 3.24, o Fitano apresenta picos varios que foram impossíveis de fazer corresponder na amostra. A aplicação deste método cromatográfico permitiu concluir que existe sobreposição entre alguns picos do padrão com os da amostra real, confirmando a existência de Fitano no Gasóleo. No entanto, são necessários mais estudos para compreender os resultados analíticos registados. A inexistência de alguns dos estereoisómeros do Fitano na amostra de Gasóleo poderá ter importância na caracterização e/ou datação da amostra, uma vez que é sabido que existe biodegradação preferencial de alguns estereoisómeros (em detrimento de outros) nas moléculas quirais.³¹

3.4 Validação do Método Analítico

De forma a avaliar as diferenças quantitativas entre as três matrizes utilizadas, realizou-se a análise utilizando os parâmetros de qualidade de metodologia analítica, como a sensibilidade, através dos limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), e linearidade e precisão para validar a técnica HS-SPME-GC-FID para uma das fases estacionárias de líquidos iónicos.

A sensibilidade foi avaliada com base no limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ), calculados a partir da regressão linear. O LOD define-se com o sinal mais baixo detectado pelo instrumento e o LOQ como o sinal mais baixo quantificável. LOD e LOQ são calculados, respectivamente, pelas equações $yB+3.3SB$ e $yB+10SB$, em que yB é o sinal obtido da média de medições de zonas sem analito e SB o desvio padrão dessas leituras. O GC-FID utilizado não permite o cálculo automático dos sinais em branco (ruído de fundo), utilizados nas equações acima descritas, tendo-se assim considerado a intercepção da recta de regressão linear no eixo das ordenadas como o sinal do branco (yB) e a estimativa do desvio padrão absoluto, Sx/y , como uma aproximação ao desvio padrão do sinal em branco (SB).¹⁰² Assim, foi possível substituir a equação original para $LOD=3.3Sx/y/b$ e $LOQ=10Sx/y/b$ (sendo b =declive da recta de regressão linear, em $y=bx+a$), encontrando assim as concentrações correspondentes aos dois limites.

A linearidade de resposta foi obtida a partir do coeficiente de correlação da regressão linear, para verificar se existe uma relação proporcional entre a resposta cromatográfica e as concentrações dos analitos estudados. A precisão foi calculada através da percentagem de desvio padrão relativo (RSD), sendo o valor de 15% considerado como o ideal para analitos orgânicos presentes em solo nas concentrações deste estudo.¹⁰³

A fase estacionária escolhida para os ensaios de validação foi a SLB IL60 (30 m x 0.25 mm x 0.2µm) no GC-FID Thermo-Finningan Focus Series, por possuir maior similaridade de polaridade com as fases estacionárias convencionais, por ser referida na literatura como a mais commumente utilizada para análise de hidrocarbonetos e por ter demonstrado melhor capacidade de separação cromatográfica para os constituintes das amostras e biomarcadores testados.

Tendo em conta os biomarcadores escolhidos, lineares e ramificados com cadeias de carbono longas, a fibra de SPME escolhida foi a PDMS. Apesar dos testes à preparação de amostra terem determinado que o tempo de extracção adequado seria uma hora, os primeiros ensaios em todas as amostras de padrões indicaram que haveria saturação da fibra durante um tempo tão longo. Assim, o tempo de exposição foi adaptado para somente 20 minutos, de forma a garantir os melhores resultados.

3.4.1 Biomarcadores em Hexano

A opção de estudar a validação de biomarcadores em hexano deriva da sua utilização como solvente comum de hidrocarbonetos; tem baixa massa molecular, não interferindo com a separação cromatográfica.

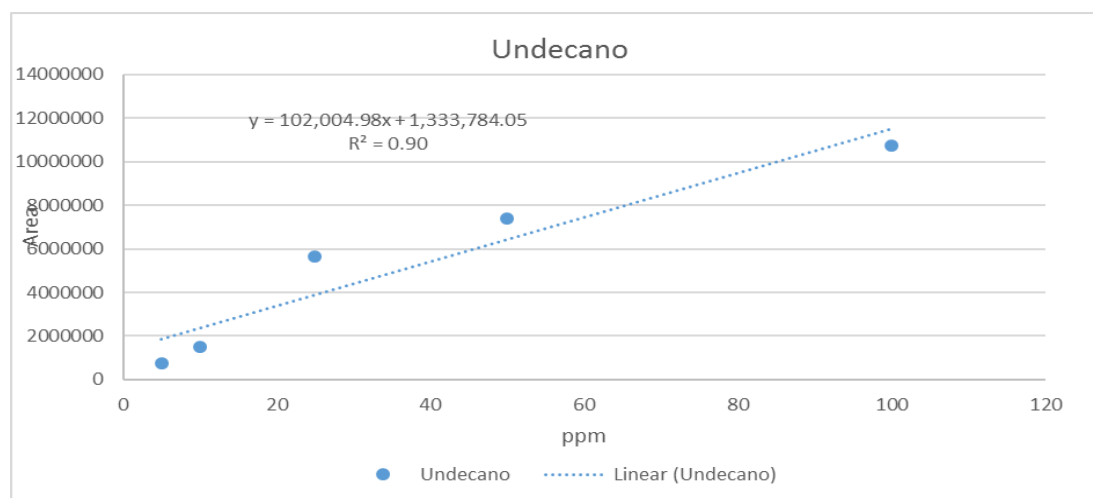


Figura 3.25 - Recta de calibração do Undecano, equação da regressão linear e coeficiente de correlação

O undecano (Figura 3.25) apresentou um coeficiente de correlação elevado mas que não permite ser inconclusivo; de acordo com a literatura, valores inferiores a 0.95 em métodos cromatográficos indicam uma necessidade de optimização ou mudança da metodologia, sendo no entanto um valor que indica que o método possui potencial de aplicação para a matriz em questão.

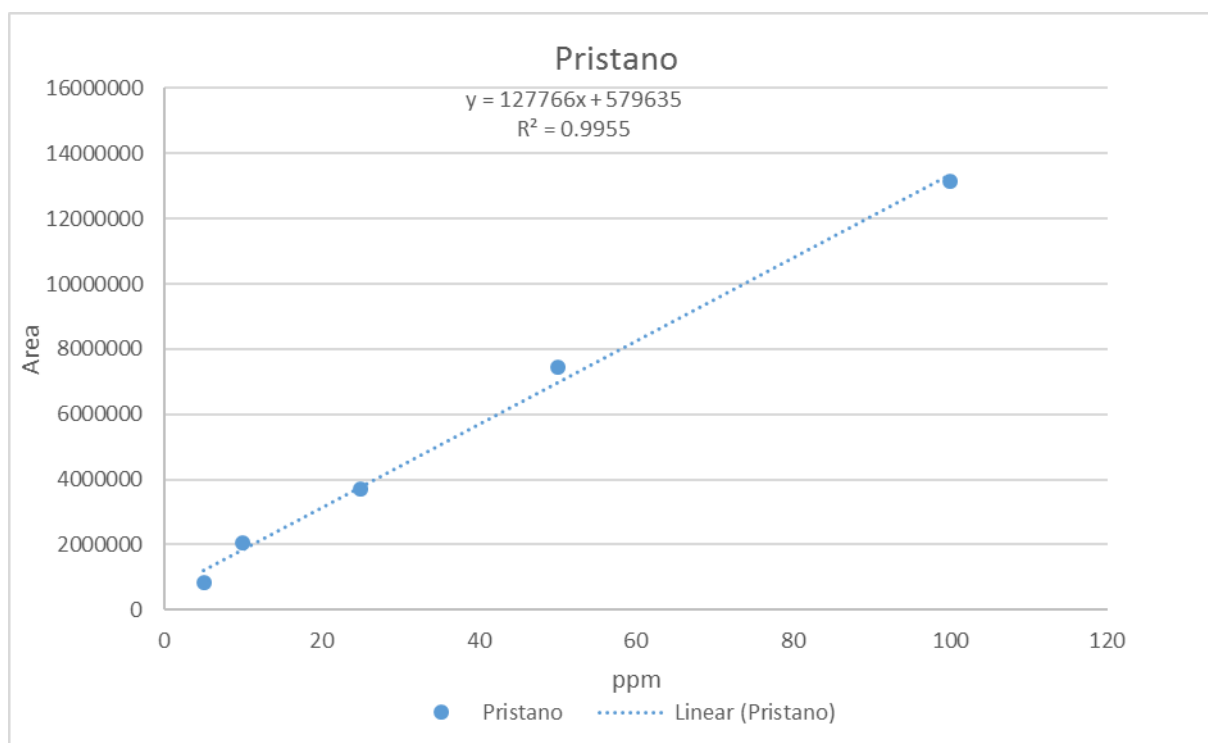


Figura 3.26 - Recta de calibração do Pristano, equação da regressão linear e coeficiente de correlação

O Pristano (Figura 3.26), pela linearidade superior demonstrada e também maior importância como biomarcador (um dos principais utilizados na datação através de rácios, como já referido), foi o escolhido para a metodologia. O coeficiente de correlação muito elevado garante proporcionalidade entre as concentrações existentes e o sinal de resposta, demonstrando que neste solvente, a metodologia HS-SPME-GC-FID com a coluna IL60 é adequada à análise de Pristano.

3.4.2 Biomarcadores em Água

A utilização de Pristano em solução aquosa para validação baseou-se na premissa da presença de humidade em todas as matrizes às quais este método seria aplicável; é expectável que a grande maioria dos solos contenham uma percentagem de água que possa mostrar-se presente após aquecimento das amostras reais, para além de ser representativo de derrames em águas subterrâneas.

O princípio que sustentou esta metodologia foi a utilização da água no estado gasoso, que tem um ponto de ebulição inferior à maioria dos hidrocarbonetos lineares e ramificados (no caso do pristano, aproximadamente 298°C), para criar um processo similar à destilação por arrastamento de vapor dentro do vial. A 98°C, o vapor de água irá ascender no vial até à zona de *headspace*, arrastando consigo partículas do analito em suspensão, apesar da imiscibilidade da água com os hidrocarbonetos; a fibra de SPME, sendo a PDMS exclusivamente não-polar, terá maior afinidade para os hidrocarbonetos (mesmo que em pequena quantidade) do que para a água que tem elevada polaridade.

Apesar da SPME, em grandes volumes de amostra, ser apenas sensível à concentração total presente (por exemplo, a colocação de uma fibra de SPME durante longos períodos de tempo para *screening* do ar será sensível à concentração total do analito presente após atingir o equilíbrio)⁴⁶, em volumes mais pequenos, esta irá extrair uma quantidade de analito proporcional ao volume presente. Assim, na técnica com água, utilizaram-se diferentes volumes de amostra (2, 4, 6, 8 e 10 µL) diluídos em 1 mL de água milli-Q para a validação.



Figura 3.27 - GC-FID do Pristano diluído em água milli-Q (5 ppm, 10 µL) na coluna IL60. Condições: 35°C (5min) -> 260°C (10min), 4°C/min, Splitless, Temp. Injector= 290°C, Temp. Detector=290°C

Esta metodologia apresentou uma boa linearidade, com um coeficiente de correlação adequado, mas não excelente (0,9609). Uma das dúvidas quanto à aplicação desta metodologia com fases estacionárias de líquidos iónicos seria a estabilidade na presença de matrizes aquosas, devido à influência dos diferentes mecanismos de interação entre a coluna e os analitos. No entanto, após análise dos cromatogramas resultantes (Figura 3.27), verificou-se que existiam poucas interferências ou picos relevantes para além do correspondente ao Pristano, confirmando a premissa da selectividade da PDMS para os hidrocarbonetos e não para a água. Apesar do FID não reagir à presença da água, a

humidade na coluna poderia levar à degradação da coluna ou um aumento do *bleeding*; na ausência destas indicações, deduz-se assim que pouca água será retida pela fibra de PDMS e que a coluna IL60 possui estabilidade e inércia na presença de água (Figura 3.28).

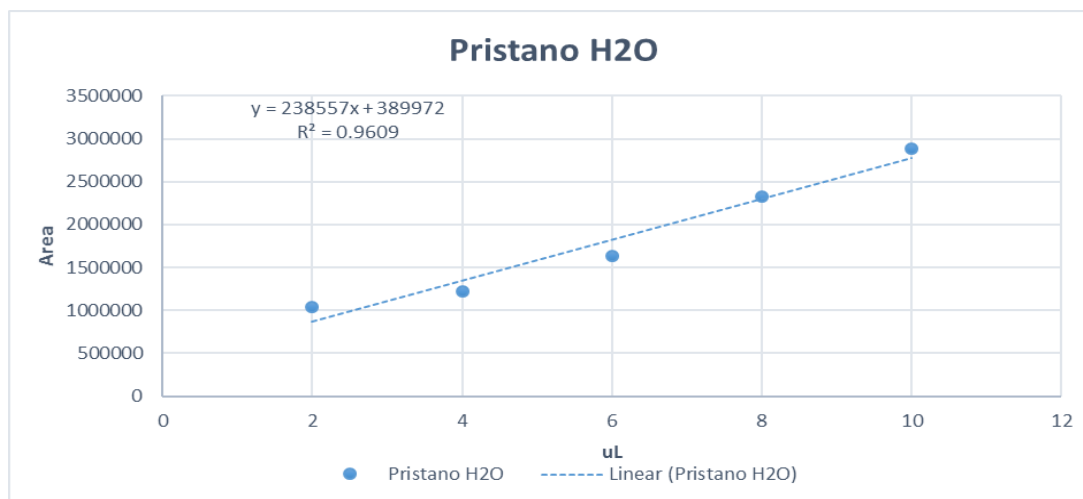


Figura 3.28 - Recta de calibração de Pristano em água (5ppm), equação da regressão linear e coeficiente de correlação

3.4.3 Biomarcadores em Mistura Padronizada

A escolha de uma mistura padronizada aplicável em metodologia ASTM surgiu de uma tentativa de aproximar a metodologia HS-SPME-GC-FID a técnicas já acreditadas (Figura 3.29). Apesar de o seu solvente, diclorometano, não ir ao encontro dos princípios da química verde pela sua toxicidade, é um dos principais solventes utilizados em soluções apolares, nomeadamente quando existe necessidade de aplicar técnicas de extracção em amostras mais complexas de hidrocarbonetos^{104,105}, como na separação de fracções de petróleo.

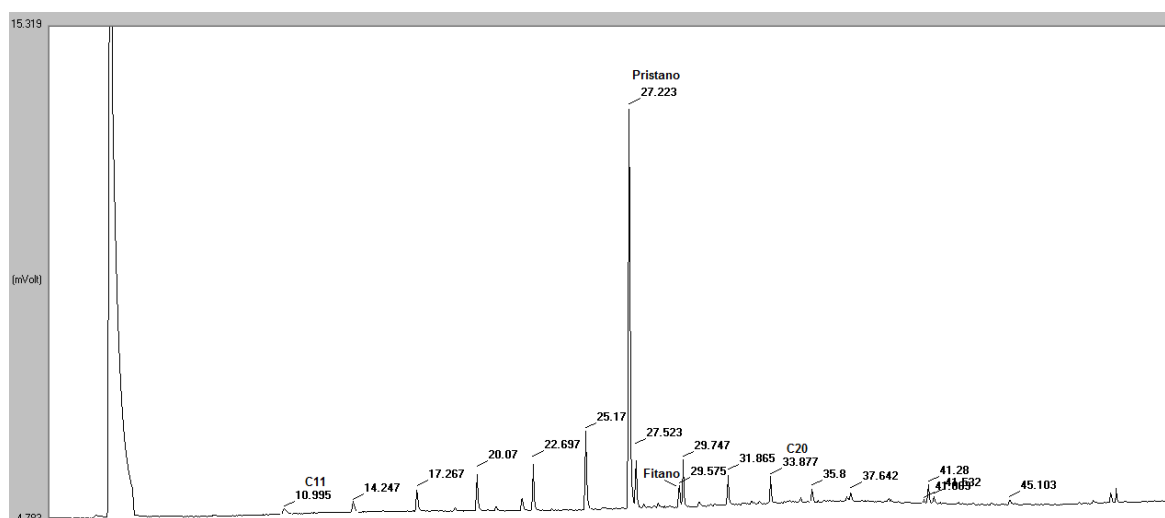


Figura 3.29 - GC-FID da Mistura Padronizada de Hidrocarbonetos com os tempos de retenção de C₁₁ a C₂₅ (Amostra a 5 ppm, com *spike* de Pristano) na coluna IL60. Condições: 35°C (5min) -> 260°C (10min), 4°C/min, Splitless, Temp. Injector= 290°C, Temp. Detector=290°C

Apesar de referido no capítulo 2.1 que foram feitos ensaios com cinco concentrações distintas, a 1 ppm não foi possível obter um cromatograma com dados suficientes para análise; apenas o pico do Pristano, devido ao *spike* era visível. Assim, somente as restantes concentrações (5, 10, 25 e 50 ppm) puderam ser estudadas.

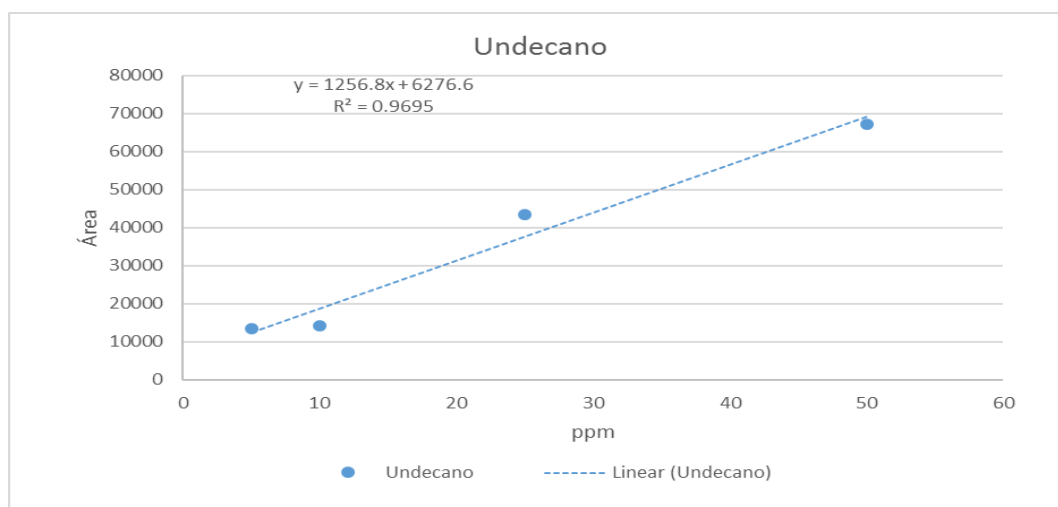


Figura 3.30 – Recta de Calibração do Undecano em Mistura Estandardizada, equação da regressão linear e coeficiente de correlação

Ambos os analitos demonstraram uma linearidade razoável (Figuras 3.30 e 3.31); embora abaixo do ideal para confiança absoluta (superior a 0.99), possuem já relevância. No entanto, após integração das áreas dos restantes hidrocarbonetos não analisados, verificou-se que alguns deles não possuíam qualquer linearidade, outros alguma linearidade e outros ainda com uma correlação considerável (>0.9).

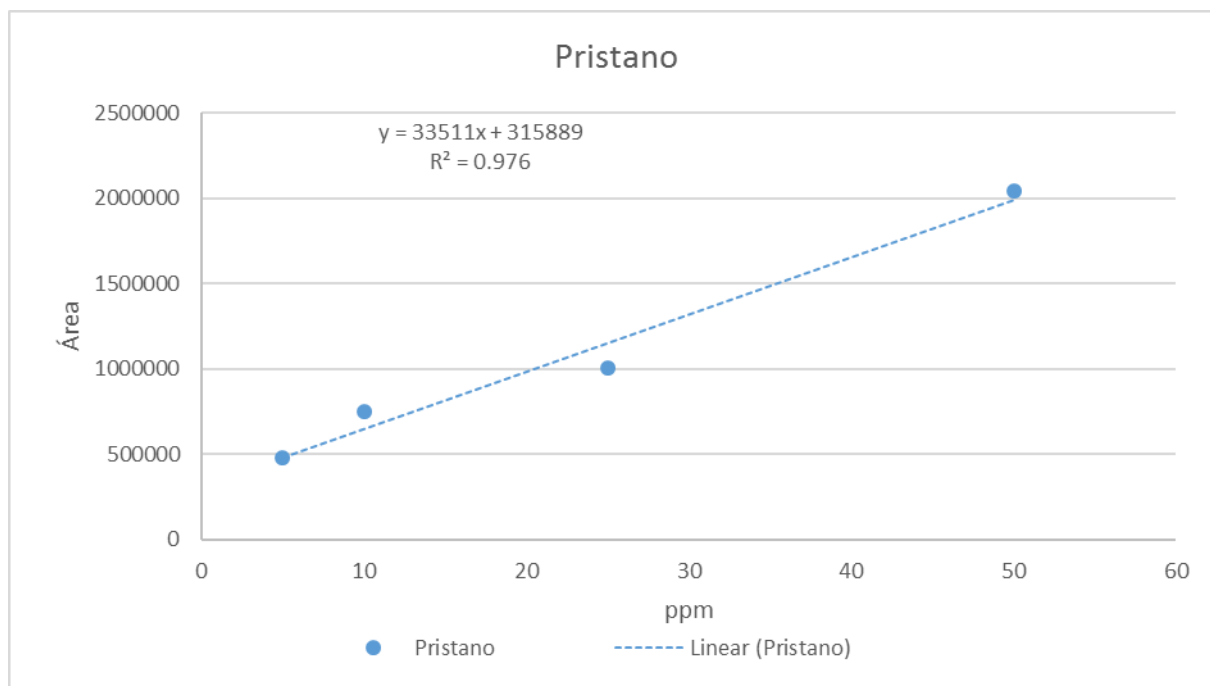


Figura 3.31 - Recta de Calibração do Pristano em Mistura Estandardizada, equação da regressão linear e coeficiente de correlação

Embora este facto não invalide a metodologia para estes dois analitos específicos, limita a aplicabilidade a amostras reais que possuam diclorometano como solvente. Possíveis alterações à metodologia deverão ser estudadas, como a utilização de outras fibras ou programas de temperatura, para determinação do motivo de o método não ser aplicável à totalidade dos hidrocarbonetos presentes nesta mistura.

Na tabela 3.1, surgem resumidos os dados para validação do método. No geral, é possível afirmar que a fase estacionária IL60 apresentou resultados bastante satisfatórios nestes ensaios iniciais. Mais optimização seria necessária para substratos específicos e para diferentes matrizes, inclusivamente testar diferentes tipos de solo devido às diferenças na actividade metabólica dos microorganismos (biodegradação) e em composição geoquímica das matrizes.

Tabela 3.1 - Parâmetros Analíticos determinados para a metodologia HS-SPME-GC-FID

<i>Composto</i>	Linearidade			Precisão		
	Concentrações ppm	Equação da Recta de calibração	R ²	LOD ppm	LOQ ppm	%RSD (n=3)
<i>Pristano/C₆</i> ⁽¹⁾	5-100	Y = 127766x + 579635	0.9955	0.4	1,3	2.27
<i>Undecano/C₆</i> ⁽²⁾	5-100	y = 102004.98x + 1333784.05	0.90	1.7	5.8	4.37
<i>Pristano/H₂O</i> ⁽³⁾	5ppm 2 a 10mL	y = 238557x + 389972	0.9609	2.2	7.4	N/A ²
<i>Pristano/DCM</i> ⁽⁴⁾	5-50	y = 33511x + 315889	0.976	0.5	1.6	1.2
<i>Undecano/DCM</i> ⁽⁵⁾	5-50	y = 1256.8x + 6276.6	0.9695	13.2	43.9	5.7

Condições

^(1, 2, 4 e 5) Preparação: 76°C, 20 min, SPME PDMS. Coluna IL60, 35°C (5min) -> 260°C (10min), 4°C/min, Splitless, Temp. Injector= 290°C, Temp. Detector=290°C

⁽³⁾ Preparação: 98°C, 20min, SPME PDMS Coluna IL60, 35°C (5min) -> 260°C (10min), 4°C/min, Splitless, Temp. Injector= 290°C, Temp. Detector=290°C

Legenda

LOD – Limite de Detecção LOQ – Limite de Quantificação RSD – Desvio Padrão Relativo

Ainda assim, e apesar das fragilidades e deficiências já referidas, com a validação do método e os ensaios de identificação de HS-SPME-GC-FID com fase estacionária de líquidos iónicos demonstrou-se boa selectividade, linearidade, resolução e versatilidade na aplicação aos biomarcadores geoquímicos dos hidrocarbonetos combustíveis derivados do petróleo.

² Realizados apenas duplicados, insuficiente para cálculo da precisão. Como valor indicativo, a precisão de n=2 é de RSD=57.16%

Capítulo 4 – Conclusões e Perspectivas

Os derrames de petróleo são uma preocupação crescente devido ao aumento das necessidades de energia da população mundial. Cada vez mais infraestruturas e veículos transportam combustíveis fósseis em grandes quantidades e colocam em perigo os ecossistemas. Por este motivo, cada vez são maiores os esforços para conhecer e punir as acções poluidoras, sejam estas propositadas ou por negligência, através da introdução de nova legislação ou tornando mais pesadas as coimas sobre os actos já consagrados em código penal. Decorrente da aplicação da lei, para garantir perícias que respondam aos quesitos, torna-se também necessário evoluir e adaptar os métodos de análise química forense à tecnologia mais moderna e eficaz, como é o caso da utilização das colunas de líquidos iónicos ou das colunas quirais para cromatografia gasosa.

Este trabalho permitiu concluir que as metodologias desenvolvidas, fazendo uso de novas fases estacionárias, possuem potencial de aplicação em investigação ambiental forense, apesar de possuírem algumas fragilidades ao nível da quantificação. Na revisão de literatura, foi possível encontrar evidências de sucesso na aplicação da SPME como método de preparação de amostra e da utilização de colunas de líquidos iónicos em diferentes tipos de análises envolvendo hidrocarbonetos, apesar de não serem ainda metodologias padronizadas e adoptadas nas análises de rotina. Apesar da validação do método ter evidenciado fragilidades ao nível da quantificação, necessária para a datação inequívoca de hidrocarbonetos, a detecção e identificação (qualitativa) dos biomarcadores foi efectuada com bastante sucesso, de forma rápida e de acordo com os princípios da química verde. Foi possível estudar o comportamento analítico de novas colunas cromatográficas de cromatografia gasosa com fases estacionárias de líquidos iónicos. Por exemplo, ao nível da coluna IL76, que se demonstrou incapaz de qualquer separação cromatográfica, é sustentada por estudos já existentes.⁷⁹ Apesar de todas as colunas testadas serem polares, verificou-se que é necessário ter em conta no seu comportamento analítico a dualidade funcional da sua estrutura química. As fragilidades referidas serão possivelmente ultrapassadas com futuras optimizações dos métodos desenvolvidos, dos testes envolvendo outras matrizes e outros biomarcadores gequímicos, e ainda, do estudo de outras colunas de líquidos iónicos. Uma potencial linha de investigação futura, que foi denotada nesta dissertação de mestrado, será o estudo dos FAMES do biodiesel no Gasóleo comercial utilizando metodologias cromatográficas similares às desenvolvidas nesta dissertação, testando-se igualmente a separação quiral.

O método desenvolvido demonstrou potencial de aplicação noutras situações em que a análise de hidrocarbonetos seja necessária; por exemplo, no estudo de hidrocarbonetos encontrados na cena de crime de fogo posto. Será necessária a extensão deste método a amostras sujeitas a pirólise (temperaturas elevadas), mas o princípio para datação de hidrocarbonetos derramados e não sujeitos a transformação pirolítica pode ser aplicável. A origem dos hidrocarbonetos (petrogénica, pirogénica e biogénica) implica a existência de diferenças na sua composição total; um método desenvolvido para hidrocarbonetos de origem pirogénica terá potencial para ser adaptado na análise de acelerantes em cenas de crime, após optimização das condições cromatográficas e de preparação de amostra. Uma outra utilização dos métodos será a da recolha de amostra em roupas ou mãos, utilizando a SPME na preparação de amostras (ao invés da absorção passiva em *headspace* por fibras de carbono, que são o método de eleição actual para aplicação a roupas¹⁰⁶), utilizando posteriormente a cromatografia com colunas de líquidos iónicos ou colunas quirais para datação dos resíduos presentes em sujeitos suspeitos.

Uma aplicação recente de novas fases estacionárias combinou os líquidos iónicos com as ciclodextrinas numa única coluna de cromatografia gasosa para enantioseparação; os comportamentos bipolares dos líquidos iónicos permitem complementar a separação quirál da ciclodextrina.¹⁰⁷ No entanto, o estudo não apresentou enantioselectividade em compostos acíclicos, embora tenha resolvido enantiómeros cíclicos sem dificuldade. Embora seja uma área promissora com novos desenvolvimentos, a formação de complexos por inclusão entre os líquidos iónicos e as ciclodextrinas dissolvidas é uma questão prévia a ultrapassar antes da aplicação directa à separação de biomarcadores quirais. A sua eficácia permitirá o estudo aprofundado de biomarcadores com quiralidade e no estudo da biodegradação enantioselectiva que estes podem sofrer. Para além da combinação com ciclodextrinas, existem também avanços muito recentes (publicados no presente ano) da aplicação dos líquidos iónicos como constituintes das fibras de SPME utilizadas na preparação de amostra¹⁰⁸; embora actualmente estejam envolvidas em conjuntos muito restritos de analitos, poderão tornar-se essenciais na preparação de amostras de hidrocarbonetos combustíveis.

A investigação aplicada a amostras contendo hidrocarbonetos, no contexto da química ambiental forense (derrames, fogo posto, poluição de águas, entre outros), utilizando as novas fases estacionárias de líquidos iónicos e de ciclodextrinas é relativamente recente e possui potencial para variados ramos de futuras pesquisas e desenvolvimentos de métodos. Pelo trabalho laboratorial desenvolvido nesta dissertação, foi possível verificar que necessita ainda de maior aprofundamento antes de se tornar numa metodologia validada de aplicação rotineira e possivelmente acreditada, possibilitando, contudo, já a identificação de biomarcadores e separações de analitos que são impossíveis ou mais dificultadas com o uso das fases estacionárias tradicionais.

Capítulo 5 - Bibliografia

¹ *Decreto-Lei 48/95 - Código Penal*. Diário da República: I série-A, Nº 63 (1993). Acedido a 27 de Janeiro de 2016, em linha, através de www.dre.pt

² *Lei 59/2007 22ª Alteração ao Código Penal*. Diário da República: série I, Nº 70 (2007). Acedido a 31 de Janeiro de 2016, em linha, através de www.dre.pt

³ Directiva 2008/99/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 19 de Novembro de 2008, relativa à protecção do ambiente através do direito penal (Texto relevante para efeitos do EEE), Acedido a 28 de Novembro de 2015, em linha, através de eur-lex.europa.eu

⁴ *Lei nº 56/2011 de 15 de Novembro - 28.ª alteração do código penal: actividades perigosas para o ambiente*, Diário da República: Série, Nº 219 (2011). Acedido a 13 de Janeiro de 2016, em linha, através de pgdlisboa.pt

⁵ Lusa (29 Janeiro 2014) Juíz de instrução manda julgar ex-presidente da Câmara de Anadia por poluição, RTP Notícias. Acedido a 17 de Março de 2016, em http://www.rtp.pt/noticias/pais/juiz-de-instrucao-manda-julgar-ex-presidente-da-camara-de-anadia-por-poluicao_n713020

⁶ Crime Ambiental (14 de Março de 2004). Correio da Manhã. Acedido a 27 de Março de 2016 em <http://www.cmjornal.pt/portugal/detalhe/crime-ambiental>

⁷ Furton, K.; Wang, J.; Hsu, Y-L.; Walton, J.; Almirall, J. (2000), The Use of Solid-Phase Microextraction–Gas Chromatography in Forensic Analysis, *Journal of Chromatographic Science*, vol. 38, pp. 297-306

⁸ Krupčík, J.; Gorovenko, R.; Špánik, I.; Bočková, I.; Sandrac, P.; Armstrong, D. (2013) On the use of ionic liquid capillary columns for analysis of aromatic hydrocarbons in low-boiling petrochemical products by one-dimensional and comprehensive two-dimensional gas chromatography, *Journal of Chromatography A*, vol. 1301, pp. 225-266

⁹ *Petroleum* [Origem e Definição], Oxford Dictionaries. Acedido a 15 de Janeiro de 2016 em <http://www.oxforddictionaries.com/pt/defini%C3%A7%C3%A3o/ingl%C3%AAs/petroleum?searchDictCode=all>

¹⁰ Acedido a 14 de Janeiro de 2016, em <http://www.opma-oacs.com/2015/01/understanding-the-crude-oil-market/>

¹¹ Speight, J. (2014) *The Chemistry and Technology of Petroleum* (5ª Ed., pp. 3-15), Boca Raton: CRC Press

¹² American Society for Testing and Materials (2015) *ASTM D4175-15c: Standard Terminology Relating to Petroleum, Petroleum Products, and Lubricants*, West Conshohocken, PA: ASTM International

¹³ Gary, J.; Handwerk, G.; Kaiser, M. (2007), *Petroleum Refining: Technology and Economics* (5th Edition, pp. 5-30), Boca Raton: CRC Press

¹⁴ Bachmann, R.T.; Johnson, A.C., Edyvean, R.G.J. (2014) Biotechnology in the petroleum industry: An overview, *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 86, pp. 225-237

- ¹⁵ U.S. Energy Information Administration - Independent Statistics and Analysis (2016) *Energy & Financial Markets - What drives crude oil prices - Demand: Non-OECD*. Acedido a 20 de Janeiro de 2016, em <https://www.eia.gov/finance/markets/demand-nonoecd.cfm>
- ¹⁶ Bragg, J.; Prince, R.; Harner, E. J., Atlas, R. (1994) Effectiveness of bioremediation for the Exxon Valdez oil spill, *Nature*, vol. 368, pp. 413-418
- ¹⁷ Sammarco, P. W.; Kolian, S.; Warby, R.; Bouldin, J. L.; Subra, W. A.; Porter, S. A. (2013) Distribution and concentrations of petroleum hydrocarbons associated with the BP/Deepwater Horizon Oil Spill, Gulf of Mexico, *Marine pollution bulletin*, vol. 73(1), pp. 129-143.
- ¹⁸ Atlas, R. (2011) Oil Biodegradation and Bioremediation: A tale of the Two Worst Spills in U.S. History, *Environmental Science & Technology*, vol. 45, pp. 6709-6715
- ¹⁹ Neff, J.; Bence, A.E.; Parker, K.; Page, D.; Brown, J.; Boehm, P. (2006) Bioavailability Of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons From Buried Shoreline Oil Residues Thirteen Years After The Exxon Valdez Oil Spill: A Multispecies Assessment, *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 25 (4), pp. 947-961
- ²⁰ Short, J.; Heintz, R. (1997) Identification of Exxon Valdez Oil in Sediments and Tissues from Prince William Sound and the Northwestern Gulf of Alaska Based on a PAH Weathering Model, *Environmental Science & Technology*, vol. 31, pp. 2375-2384
- ²¹ Welsch, E.; (Maio de 2001), *Size of Oil Spill in Canada Grows*, The Wall Street Journal, Acedido a 12 de Janeiro de 2016, em www.wsj.com/articles/SB10001424052748704322804576303440805617516
- ²² Yang, C.; Wang, Z.; Yang, Z.; Hollebone, B.; Brown, C.; Landriault, M.; Fieldhouse, B. (2011) Chemical Fingerprints of Alberta Oil Sands and Related Petroleum Products, *Environmental Forensics*, vol. 12, pp. 173-188
- ²³ US Department of Transportation - Pipeline & Hazardous Materials Safety Administration (2016), *Pipeline Incident 20 Year Trends*, Acedido a 20 de Janeiro de 2016, em <http://www.phmsa.dot.gov/pipeline/library/data-stats/pipelineincidenttrends>
- ²⁴ Moreira, S.; Moreira-Santos, M.; Ribeiro, R.; Guilhermino, L. (2004) The ‘Coral Bulker’ Fuel Oil Spill on the North Coast of Portugal: Spatial and Temporal Biomarker Responses in *Mytilus galloprovincialis*, *Ecotoxicology*, vol. 13 (7), pp. 619-630
- ²⁵ Tim-Tim, A. L. S.; Morgado, F.; Moreira, S.; Rangel, R.; Nogueira, A.; Soareas, A.; Guilhermino, L. (2009) Cholinesterase and glutathione S-transferase activities of three mollusc species from the NW Portuguese coast in relation to the ‘Prestige’ oil spill, *Chemosphere*, vol. 77 (11), pp. 1465-1475
- ²⁶ Biomarkers Definitions Working Group (2001) Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework, *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, vol. 69 (3), pp. 89-95
- ²⁷ Wang, Z.; Stout, S.; Fingas, M. (2006) Forensic Fingerprinting of Biomarkers for Oil Spill Characterization and Source Identification, *Environmental Forensics*, vol. 7 (2), pp. 105-146
- ²⁸ Wang, Z.; Fingas, M.; Page, D. (1999) Oil spill identification, *Journal of Chromatography A*, vol. 843, pp. 369-411

- ²⁹ Kaplan, I.; Galperin, Y.; Lu, S-T.; Lee, R-P. (1997) Forensic Environmental Geochemistry: differentiation of fuel-types, their sources and release time, *Organic Geochemistry*, vol. 27 (5/6), pp. 289-317
- ³⁰ Moldowan, J.; Wolfgang, S. (1980) First Discovery of Botryococcane in Petroleum, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, vol. 19, pp. 912-914
- ³¹ Peters, K.; Walters, C.; Moldowan, J. M. (2005) *The Biomarker Guide Volume 2 - Biomarkers and Isotopes in Petroleum Exploration and Earth History* (2^a Ed., pp. 465-641), United Kingdom: Cambridge University Press
- ³² Kaplan, I.; Lu, S-T.; Alimi, H. M.; MacMurphey, J (2001) Fingerprinting of high boiling hydrocarbon fuels, asphalts and lubricants. *Environmental Forensics*, vol. 2, pp. 231–248.
- ³³ San Nacianceno Fernández, V.; Dorronsoro, Urrutia, C. (2007) Costa Guipuzcoana: El «Flysch». Análisis orgánico y caracterización mineralógica de los sedimentos, *Geogaceta*, vol. 41, pp. 195-198,
- ³⁴ Frysinger, G.; Gaines, R.; Xu, L.; Reddy, C. (2003) Resolving the Unresolved Complex Mixture in Petroleum-Contaminated Sediments, *Environmental Science & Technology*, vol. 37 (8), pp. 1653-1662
- ³⁵ Zhang, Z.; Pawliszyn, J. (1993) Headspace solid-phase microextraction, *Analytical Chemistry*, vol. 65 (14), pp. 1843-1852.
- ³⁶ Hinshaw, J.V. (2003) Solid-Phase microextraction. *LC•GC Europe*, pp. 2-5
- ³⁷ Björklund, E.; Nilsson, T. (2000) Pressurised liquid extraction of persistent organic pollutants in environmental analysis, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 19 (7), pp. 434-445
- ³⁸ Jacobsen, A. M.; Halling-Sørensen, B.; Ingerslev, F.; Hansen, S.H. (2004) Simultaneous extraction of tetracycline, macrolide and sulfonamide antibiotics from agricultural soils using pressurised liquid extraction, followed by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, vol. 1038 (1-2), pp. 157-170
- ³⁹ Ramos, L.; Kristenson, E.M.; Brinkman, U.A.Th (2002) Current use of pressurised liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis, *Journal of Chromatography A*, vol. 975 (1), pp. 3-29
- ⁴⁰ Liška, I. (2000) Fifty years of solid-phase extraction extraction in water analysis - historical development and overview, *Journal of Chromatography A*, vol. 885 (1-2), pp. 3-16
- ⁴¹ Jinno, K.; Muramatsua, T.; Yoshihiro Saitoa, Y.; Kisob, Y.; Magdicc, S.; Pawliszync, J. (1996) Analysis of pesticides in environmental water samples by solid-phase micro-extraction—high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, vol. 754 (1-2), pp. 137-144
- ⁴² Hirata, Y.; Pawliszyn, J. (2005) Solvent-free sample introduction for supercritical fluid chromatography using polymer coated fibers, *Journal of Microcolumn Extractions*, vol. 6 (5), pp. 443–447
- ⁴³ Lu, Q.; Chen, L.; Lu, M.; Chen, G.; Zhang L. (2010) Extraction and Analysis of Auxins in Plants Using Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Followed by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, vol. 58 (5), pp. 2763–2770.

- ⁴⁴ Mindrup, R.; Shirey, R. (2001) Supelco - Improved Performance of SPME Fibers and Applications, Sigma-Aldrich, Acedido a 27 de Janeiro de 2016 em <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/Brochure/10942.pdf>
- ⁴⁵ Sigma-Aldrich (2016), Carboxen® Adsorbents, Acedido a 13 de Dezembro de 2015 em <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/analytical-products.html?TablePage=14540720>
- ⁴⁶ Pawliszyn, J. (2000), Theory of Solid-Phase Microextraction, *Journal of Chromatographic Science*, vol.38, pp. 270-278
- ⁴⁷ Rouessac, F.; Rouessac, A. (2005) *Chemical Analysis: Modern Instrumentation Methods and Techniques* (2ª Edição), West Sussex: John Wiley & Sons
- ⁴⁸ Grob, R.L.; Barry, E.F (2004) *Modern practice of gas chromatography*, (3ª Edição, pp. 25-65, 277-490) Hoboken: Wiley-Interscience, pp. 30
- ⁴⁹ Acedido a 24 de Janeiro de 2016 em <http://www.chromedia.org/dchro/gfx/ZapdlvkHC.jpeg>
- ⁵⁰ Higson, S. (2004) *Analytical Chemistry*, Oxford: Oxford University Press
- ⁵¹ Wang, Z.; Fingas, M. (1997) Developments in the analysis of petroleum hydrocarbons in oils, petroleum products and oil-spill-related environmental samples by gas chromatography, *Journal of Chromatography A*, vol. 774, pp. 51-78
- ⁵² Dass, C. (2007) *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry* (pp. 4-53), New Jersey: Wiley-Interscience
- ⁵³ Dass, C. (2001) *Principles and Practice of Biological Mass Spectrometry*, New Jersey: Wiley-Interscience
- ⁵⁴ Gross, J. (2006) *Mass Spectrometry: A Textbook* (pp. 1-35), Berlin: Springer-Verlag
- ⁵⁵ Wollnik, H. (2005) Time-of-flight mass analyzers, *Mass Spectrometry Reviews*, vol. 12 (2), pp. 89-114
- ⁵⁶ Dawson, P; *Quadrupole Mass Spectrometry and Its Applications* (pp. 19-36, 46-56), Amsterdam: Elsevier
- ⁵⁷ Marshall, A.G.; Hendrickson C.L; Jackson, G.S. (1998) Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: a primer, *Mass Spectrometry Reviews*, vol. 17 (1), pp. 1-35
- ⁵⁸ Allen, S. (1939) The Detection of Single Positive Ions, Electrons and Photons by a Secondary Electron Multiplier, *Physical Review*, vol. 55 (10), pp. 966-971
- ⁵⁹ Brown, K.L.; Tautfest, G (1956) Faraday-Cup Monitors for High-Energy Electron Beams, *Review of Scientific Instruments*, vol. 27 (9), pp. 696-702
- ⁶⁰ Dubois, F.; Knochenmuss, R.; Zenobi, R.; Brunelle, A.; Deprun, C.; Le Beyec, Y. (1999) A comparison between ion-to-photon and microchannel plate detectors, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, vol. 13 (9), pp. 786-791
- ⁶¹ Wiza, J. (1979) Microchannel plate detectors, *Nuclear Instruments and Methods*, vol. 162 (1-3), pp. 587-601

- ⁶² Wang, Z.; Fingas, M.; Sergy, G. (1994) Study of 22-Year-Old Arrow Oil Samples Using Biomarker Compounds by GC/MS, *Environmental Science & Technology*, vol. 28, pp. 1773-1746
- ⁶³ Mendez, A.; Meneghini, R.; Lubkowitz, J. (2007) Physical and Chemical Characterization of Petroleum Products by GC–MS, *Journal of Chromatographic Science*, vol. 45, pp. 683-689
- ⁶⁴ Frysinger, G.; Gaines, R. (2001), Separation and identification of petroleum biomarkers by comprehensive two-dimensional gas chromatography, *Journal of Separation Science*, vol. 24, pp. 87-96
- ⁶⁵ Antle, P.; Zeigler, C.; Robbat Jr., A. (2014) Retention behavior of alkylated polycyclic aromatic sulfurheterocycles on immobilized ionic liquid stationary phases, *Journal of Chromatography A*, vol. 1361, pp. 255-264
- ⁶⁶ Walden, P. (1914) Ueber die Molekulargrösse und elektrische Leitfähigkeit einiger geschmolzenen Salze, *Bulletin de l'Académie Impériale des Sciences de St.-Petersbourg, VI série*, vol. 8 (6) , pp. 405–422
- ⁶⁷ Wilkes, J.; Levisky, J.; Wilson, R.; Hussey, C. (1982) Dialkylimidazolium chloroaluminate melts: a new class of room-temperature ionic liquids for electrochemistry, spectroscopy and synthesis, *Inorganic Chemistry*, vol. 21 (3), pp. 1263-1264
- ⁶⁸ Koel, M. (2008) *Ionic Liquids in Chemical Analysis*, Boca Raton: CRC Press pp. xxvii-xxx
- ⁶⁹ Walker, A.J.; Bruce N.C (2004) Cofactor-dependent enzyme catalysis in functionalized ionic solvents, *Chemical Communications*, vol. 22, pp. 2570-2571
- ⁷⁰ Armstrong, D.; He, L.; Liu, Y-S. (1999), Examination of Ionic Liquids and Their Interaction with Molecules, When Used as Stationary Phases in Gas Chromatography, *Analytical Chemistry*, vol. 71, pp. 3873-3876
- ⁷¹ Wilkes, J. S. (2002), A short history of ionic liquids—from molten salts to neoteric solvents, *Green Chemistry*, vol. 4, pp. 73-80
- ⁷² Harris, D. (1999) *Quantitative Chemical Analysis* (5ª Edição), W. H. Freeman
- ⁷³ Sigma-Aldrich (2013) *Supelco Ionic Liquid GC Columns: Introduction to the Technology*, Acedido a 14 de Agosto de 2015, em https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/Posters/1/ionic_liquid_gc_columns.pdf
- ⁷⁴ Berthod, A. (1995) Determination and Use of Rohrschneider-McReynolds Constants for Chiral Stationary Phases Used in Capillary Gas Chromatography, *Analytical Chemistry*, vol. 67, pp. 849-857
- ⁷⁵ Sidisky, L.M.; Baney, G. A.; Desorcie, J.L.; Schollenberger, D.L.; Serrano, G.; Stenerson, K.K. (May, 2014) Polyionic Ionic Liquid GC Stationary Phase Evaluations, *38th International Symposium on Capillary Chromatography*, Italy: Riva del Garda
- ⁷⁶ Gu, Q.; David, F.; Lynen, F.; Vanormeligen, P.; Vynerman, W.; Rumpel, K.; Xu, G.; Sandra, P. (2011) Evaluation of ionic liquid stationary phases for one dimensional gas chromatography–mass spectrometry and comprehensive two dimensional gas chromatographic analyses of fatty acids in marine biota, *Journal of Chromatography A*, vol. 1218, pp. 3056-3063

- ⁷⁷ Ragonese, C.; Sciarrone, D.; Tranchida, P.; Dugo, P.; Dugo, G.; Mondello, L. (2011) Evaluation of a Medium-Polarity Ionic Liquid Stationary Phase in the Analysis of Flavor and Fragrance Compounds, *Analytical Chemistry*, vol. 83, pp. 7947-7954
- ⁷⁸ Sidisky, L.M.; Baney, G.A.; Desorcie, J.L.; Schollenberger, D.L.; Serrano, G.; Stenerson, K.K. (May 2014) Evaluation of a New Ionic Liquid Stationary Phase with PEG Like Selectivity, *Chromatography Today*, pp. 30-33
- ⁷⁹ Cagliero, C.; Bicchi, C.; Cordero, C.; Liberto, E.; Sgorbini, B.; Rubiolo, P. (2012) Room temperature ionic liquids: New GC stationary phases with a novel selectivity for flavor and fragrance analyses, *Journal of Chromatography A*, vol. 1268, pp. 130-138
- ⁸⁰ Ragonese, C.; Sciarrone, D.; Tranchida, P.; Dugo, P.; Mondello, L. (2012) Use of ionic liquids as stationary phases in hyphenated gas chromatography techniques, *Journal of Chromatography A*, vol. 1255, pp. 130-144
- ⁸¹ Mahé, L.; Dutriez, T.; Courtiade, M.; Thiébaud, D.; Dulot, H.; Bertoncini, F. (2011) Global approach for the selection of high temperature comprehensive two-dimensional gas chromatography experimental conditions and quantitative analysis in regards to sulfur-containing compounds in heavy petroleum cuts, *Journal of Chromatography A*, vol. 1218, pp. 534-544
- ⁸² Yuan, L.; Renwei, L.; Shixin, Z.; Binjie, L. (2001) Sedimentary environment indicators: Benzothiazole and its derivatives, *Chinese Science Bulletin*, vol. 46, pp. 413-417
- ⁸³ Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S.; Wothers, P. (2012) *Organic Chemistry* (2ª Edição, pp. 382-400), OUP Oxford
- ⁸⁴ Kreidler, D.; Czesla, H.; Schurig, V. (2008) A mixed stationary phase containing two versatile cyclodextrin-based selectors for the simultaneous gas chromatographic enantioseparation of racemic alkanes and racemic α -amino acid derivatives, *Journal of Chromatography B*, vol. 875, pp. 208-216
- ⁸⁵ Britto, M.; Nascimento Jr., C.; Santos, H. (2004) Análise estrutural de Ciclodextrinas: um estudo comparativo entre métodos teóricos clássicos e quânticos, *Química Nova*, vol. 27 (6), pp. 882-888
- ⁸⁶ Shityakov, S.; Broscheit, J.; Förster, C. (2012) α -Cyclodextrin dimer complexes of dopamine and levodopa derivatives to assess drug delivery to the central nervous system: ADME and molecular docking studies, *International Journal of Nanomedicine*, vol. 7, pp. 3211-3219
- ⁸⁷ Agilent Technologies (s.d.) *Capillary CP-Chirasil-Dex CB*, Acedido a 21 de Fevereiro de 2016 em <https://www.agilent.com/en-us/products/gas-chromatography/gc-columns/capillary/cp-chirasil-dex-cb>
- ⁸⁸ Agilent Technologies (2012), *Agilent J&W GC Column Selection Guide*, Acedido a 27 de Fevereiro de 2016 em http://www.agilent.com/cs/library/catalogs/Public/5990-9867EN_GC_CSG.pdf
- ⁸⁹ Weiner, E. (2013) *Applications of Environmental Aquatic Chemistry: A Practical Guide* (3ª Edição, pp. 325-329), Boca Raton: CRC Press
- ⁹⁰ Agilent Technologies, Inc (2010) *Aromatic hydrocarbons, C6-C8 High resolution separation of xylene isomers*, Acedido a 24 de Fevereiro em <https://www.agilent.com/cs/library/applications/A01897.pdf>

- ⁹¹ Huang, K.; Armstrong, D. (2009) GC–MS analysis of crocetane, phytane and some of their stereoisomers using cyclodextrin-based stationary phases, *Organic Geochemistry*, vol. 40, 283-286
- ⁹² Harrison, B.; Zhang, H.; Berelson, W.; Orphan, V. (2009), Variations in Archaeal and Bacterial Diversity Associated with the Sulfate-Methane Transition Zone in Continental Margin Sediments (Santa Barbara Basin, California), *Applied Environmental Microbiology*, vol. 75 (6), pp. 1487-1499
- ⁹³ Sicoli, G.; Kreidler, D.; Czesla, H.; Hopf, H.; Schruig, V. (2009) Gas Chromatographic Enantioseparation of Unfunctionalized Chiral Alkanes: A Challenge in Separation Science (Overview, State of the Art, and Perspectives), *Chirality*, vol. 21, pp. 183-198
- ⁹⁴ Kaplan, I.; Galperin, Y.; Alimi, H.; Lee, R-P.; Lu, S-T. (1996) Patterns of chemical changes during environmental alteration of hydrocarbon fuels, *Groundwater Monitoring & Remediation*, vol. 16 (4) pp. 113-124
- ⁹⁵ Bastow, T. (1998) *Sedimentary Processes Involving Aromatic Hydrocarbons* (Tese Doutoral), Curtin University of Technology, Perth, Australia
- ⁹⁶ Alexander, R.; Bastow, T. P.; Kagi, R.; Singh, R. K. (1992) Identification of 1,2,2,5-Tetramethyltetralin and 1,2,2,5,6-Pentamethyltetralin as Racemates in Petroleum, *Journal of Chemical Society, Chemical Communications*, vol. 23, pp. 1712-1714
- ⁹⁷ Bornshchein, R.; Hastings, L.; Manson, J. (1980) Behavioral toxicity in the offspring of rats following maternal exposure to dichloromethane, *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 52 (1), pp. 29-37
- ⁹⁸ Rainey J.M. Jr. (1977) Disulfiram toxicity and carbon disulfide poisoning, *The American Journal of Psychiatry*, vol. 134 (4), pp. 371-378
- ⁹⁹ Monfreda, M.; Gregori, A. (2011) Differentiation of Unevaporated Gasoline Samples According to Their Brands, by SPME–GC–MS and Multivariate Statistical Analysis, *Journal of Forensic Sciences*, vol. 56(2), pp. 372-380
- ¹⁰⁰ Han, D.; Row, K. H. (2010) Recent Applications of Ionic Liquids in Separation Technology, *Molecules*, vol. 15(4), pp. 245-2426
- ¹⁰¹ Sidisky, L.M.; Baney, G.A.; Desorcie, J.L.; Stenerson, K.K.; Shollenberger, D.L. (2014) *FAME Analysis with Ionic Liquid Capillary Columns*. Acedido em a 14 de Agosto de 2016 em <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/Posters/1/T414069H.pdf>
- ¹⁰² IPAC (2011). Guia para a acreditação de laboratórios químicos OGC002. *Instituto Português da Acreditação*, pp. 1-12.
- ¹⁰³ Environment Agency (2012) *Monitoring Certification Scheme - Performance Standard for Laboratories Undertaking Chemical Testing of Soil*, United Kingdom
- ¹⁰⁴ Corrêa, S.M.; Arbilla, G. (2006) Aromatic hydrocarbons emissions in diesel and biodiesel exhaust, *Atmospheric Environment*, vol. 40 (35), pp. 6821-6826
- ¹⁰⁵ Schwab, A.P.; Su, J.; Wetzel, S.; Pekarek, S.; Banks, M.K. (1999) Extraction of Petroleum Hydrocarbons from Soil by Mechanical Shaking, *Environmental Science & Technology*, vol. 33 (11), pp. 1940-1945

- ¹⁰⁶ Borusiewicz, R. (2002) Fire Debris Analysis - A survey of Techniques used for accelerants isolation and concentration, *Z Zagadnien Nauk Sadowych*, vol. 50, pp. 44-63
- ¹⁰⁷ Berthod, A.; He, L.; Armstrong, D. (2001) Ionic Liquids as Stationary Phase Solvents for Methylated Cyclodextrins in Gas Chromatography, *Chromatographia*, vol. 59 (1/2), pp. 63-68
- ¹⁰⁸ Sun, M.; Feng, J.; Bu, Y.; Luo, C. (2016), Ionic liquid coated copper wires and tubes for fiber-in-tube solid-phase microextraction, *Journal of Chromatography A*, vol. 1458, pp. 1-8